Über katalatische und peroxydatische Wirkungen des Blutfarbstoffs und seiner Derivate

---

Inaugural-Dissertation

zur

Erlangung der Doktorwürde

der

Philosophischen Fakultät (II. Sektion)

der Ludwig-Maximilians-Universität

zu München

vorgelegt von

Ludwig Brann

aus Berlin

Universitätsverlag von Robert Noske in Borna-Leipzig

1928

Berichterstatter: Geheimrat Professor Dr. Wieland

Tag der mündlichen Prüfung: 19. Juli 1927

R. UNIV.
BIBLIOTHEEK
LEIDEN

Dem Andenken
meines lieben Vaters

Inhalt

Seite

I. Kapitel: Physikalisch-chemische Grundlagen der Darstellung von reaktions-kinetischen Untersuchungen 1

A. Die verschiedenen Methoden zur Aufklärung von Reaktionsmechanismen 1
B. Grenzen der Anwendbarkeit des Massenwirkungsgesetzes . . 3
C. Bestimmung der Gleichgewichtslage 7
D. Der Temperaturkoeffizient der Reaktionsgeschwindigkeit und die Aktivierungswärme 8

II. Kapitel: Theorien über katalysierte Reaktionen 10

A. Oberflächenkatalysen und reaktionsteilnehmende Katalysatoren 10
B. Zusammenhänge zwischen Katalyse und Konstitution 12

III. Kapitel: Theorien der biologischen Oxydationsprozesse 13

A. Die Möglichkeiten der Teilnahme des Oxyhämoglobins an peroxydatischen Reaktionen 13
B. Die wichtigsten Grundzüge der verschiedenen Oxydationstheorien 15
C. Die peroxydatischen Reaktionen 17
D. Speziellere Vorstellungen 18

IV. Kapitel: Die Konstitution des Hämins 19

A. Das Dihydrohämin 19
B. Die verschiedenen Konstitutionsformeln des Hämins 22
C. Die Argumente für die Küstersche und die Fischersche Formulierung 28
D. Die Stützung der Küsterschen Formel durch das Dihydrohämin . 30
E. Das Problem der ungesättigten Seitenketten 34
F. Die Bindungsart des Eisens 34
G. Die Theorie von Kunz und Kresz 36
H. Die Vorgänge bei der Auflösung des Hämins 39
I. Das „Pyridinhämin“ 40
K. Das „Perhydrohämin“ 42

V. Kapitel: Magnetische Messungen 43

VI. Kapitel: Spektroskopische Messungen 50

VII. Kapitel: Kristallographische Messungen 54

VIII. Kapitel: Die katalatischen und peroxydatischen Reaktionsbeschleunigungen 57

A. Historische Übersicht 57
1. Die katalatische Hydroperoxydzersetzung 57
2. Die peroxydatische Jodwasserstoffzersetzung 61
B. Besprechung der Versuchsergebnisse 65
1. Die katalatischen Wirkungen des „Na_2HPO_4-hämins“ . . . 66
2. Die katalatischen Wirkungen des „Pyridin-hämins“ 78

Seite

3. Häminkatalaseversuche in 75%igem Pyridin 86
4. Die peroxydatischen Wirkungen des Hämins 89
5. Gleichzeitige katalatische und peroxydatische Wirkung des Hämins 99
6. Die Schädigung des Hämins 100
7. Der Vergleich des Hämins mit anderen Katalysatoren . . . 102
8. Einige Versuche über die Beschleunigung anderer peroxydatischer Reaktionen 125

C. Übersicht über die Leistungsfähigkeit verschiedener Katalysatoren 127

IX. Kapitel: Experimentelle Daten 129

A. Tabellarische Zusammenstellung der dem Kapitel VIII zugrunde liegenden Messungen 129
B. Einige analytische Angaben 147
C. pH- und pCl-Messungen 149

Kurze Zusammenfassung der wichtigsten Ergebnisse der Arbeit . . . 151

Nachwort 153

Die vorliegende Arbeit ist unter Leitung von Herrn Professor Dr. Richard Kuhn teils im Chemischen Laboratorium des Staates zu München, teils im Laboratorium für analytische und allgemeine Chemie der Eidgen. Technischen Hochschule in Zürich angefertigt worden.

Ich spreche meinen hochverehrten Lehrern, Herrn Geheimrat Professor Dr. Theodor Curtius, Herrn Geheimrat Professor Dr. Richard Willstätter, Herrn Geheimrat Professor Dr. Heinrich Wieland, in deren Laboratorien ich meine chemische Ausbildung erhielt, auch an dieser Stelle meinen besten Dank aus.

Zu ganz besonderem Dank bin ich aber vor allem Herrn Professor Dr. Richard Kuhn verpflichtet, der mich bei der Anfertigung dieser Arbeit stets in hervorragender Weise unterstützte.

I. Kapitel.

Physikalisch-chemische Grundlagen der Darstellung von reaktionskinetischen Untersuchungen.

A. Die verschiedenen Methoden zur Aufklärung von Reaktionsmechanismen.

Aufgabe der Chemie ist es, die Eigenschaften und die Umwandlungen der Stoffe zu beschreiben. Beide Aufgaben greifen oft ineinander über und ein letztes noch in weiter Ferne liegendes Ziel ist es, solche Formelbilder aufzustellen, daß sich aus ihnen alle Eigenschaften und Reaktionen des betreffenden Stoffes ablesen lassen.

Aber nicht nur die Art der Reaktionen eines Stoffes resp. eines Stoffpaares ist von Interesse, sondern auch der Verlauf, den eine Reaktion nimmt. Um hierin Einblick zu gewinnen, stehen verschiedene Wege zur Verfügung. Die klassische Methode ist die Isolierung von Zwischenprodukten der Reaktion; daß man wirklich Zwischenprodukte und nicht etwa Nebenprodukte der Reaktion gefaßt hat, sucht man dadurch zu beweisen, daß das isolierte Zwischenprodukt unter den ursprünglichen Reaktionsbedingungen zur Bildung des Endproduktes befähigt ist. Ein Beispiel für diese Arbeitsweise ist die durch H. Wieland[1]) erfolgte Aufklärung der Entstehung der Knallsäure aus Äthylalkohol und Salpetersäure. Ein möglicher Einwand gegen die aus der Isolierung von Zwischenprodukten gezogenen Schlüsse ist der schon von W. Ostwald[2]) erhobene, daß der über das isolierte Zwischenprodukt führende Reaktionsweg zwar ein möglicher Weg ist, aber nicht unbedingt der einzigste oder sogar nicht einmal der hauptsächlichste Reaktionsweg sein muß. Immerhin können die auf diesem Weg gewonnenen Schlüsse, vor allem wenn eine große Ausbeute an dem Zwischenprodukt möglich ist, ein hohes Maß von Wahrscheinlichkeit haben. Unsicherer ist diese Art der Beweisführung, wenn man ein Zwischenprodukt nur durch die vor allem von C. Neuberg[3]) angewandte Abfangmethode isolieren kann. In Anwesenheit des Abfangmittels verläuft die Reaktion dann nicht unter normalen, sondern unter

[1]) B. **40**, 418 (1907).
[2]) Grundriß der allg. Chemie 5. Aufl. 1917 S. 607/08.
[3]) Bio.Z. **78**, 238 (1916); Bio.Z. **89**, 365 (1918) und Bio.Z. **92**, 234 (1918).

veränderten, gewissermaßen pathologischen Bedingungen, und wie es in der Medizin nicht zulässig ist, die Ergebnisse der Pathologie ohne weiteres auf die Physiologie zu übertragen, so kann evtl. der ganze Reaktionsverlauf durch das Abfangmittel geändert werden. Trotzdem lassen sich auch auf diesem Weg manchmal recht tragfähige Anschauungen über den Reaktionsmechanismus eines Vorgangs gewinnen; ich erinnere an Neubergs[3]) Theorie der alkoholischen Gärung und an G. Kleins[4]) Nachweis der Formaldehydbildung bei der Assimilation. Ein dritter Weg ist der des Analogieschlusses; so folgert z. B. H. Wieland[5]) aus der Entstehung des Nitro-äthylalkohols (bzw. seines Salpetersäure-esters) bei der Nitrierung des Äthylens, daß ein ähnlicher Reaktionsmechanismus bei der Nitrierung aromatischer Körper besteht, wo dann in zweiter Phase durch Wasserabspaltung der aromatische Nitrokörper gebildet wird.

Gemeinsam ist diesen drei Methoden ein hohes Maß von Anschaulichkeit, während die physikalisch-chemischen Methoden zur Ermittlung des Reaktionsverlaufes wohl an Exaktheit diesen gleichkommen, ja sie manchmal sogar übertreffen, dafür aber weit weniger Anschaulichkeit besitzen. Als Beispiele für die Aufklärung eines Reaktionsmechanismus durch kinetische Verfolgung des Reaktionsverlaufes seien genannt: Die Untersuchung der Reaktion zwischen Toluol-sulfo-chlorid und Anilin durch F. Ebel[6]); die Tatsache, daß die Reaktionsgeschwindigkeit der vierten Potenz der Anilinkonzentration proportional ist, ferner der Umstand, daß zugesetztes Dimethyl-anilin nur proportional seiner Konzentration die Reaktion beschleunigt, machen es äußerst wahrscheinlich, daß sich primär ein Komplex aus einem Molekül Toluol-sulfochlorid und drei Molekülen Anilin bildet, der dann weiter mit einem Molekül Base (Anilin oder Dimethylanilin) unter Bildung von Toluolsulf-anilid und salzsaurem Anilin reagiert. Ferner ist die Untersuchung der Stärkeverzuckerung durch R. Kuhn[7]) ein besonders interessantes Beispiel der physikalisch-chemischen Reaktionsaufklärung, denn die kinetische Verfolgung der Reaktion hat nicht nur Schlüsse über den Reaktionsmechanismus, sondern auch solche über die Konstitution der Stärke ermöglicht. Es wird dadurch veranschaulicht, wie zuweilen struktur-chemische Probleme und Fragen der Reaktionskinetik ineinander übergreifen.

---

[4]) G. Klein u. O. Werner, Bio.Z. **168**, 361 (1926).

[5]) H. Wieland u. E. Sakellarios, B. **52**, 898 (1919) und Bio.Z. **53**, **201** (1920).

[6]) Vortrag auf der Tagung Südwestdeutscher Chemiker, München, 23. April 1927, inzwischen erschienen B. **60**, 2079, 1927.

[7]) A. **443**, 1 (1925).

B. Grenzen der Anwendbarkeit des Massenwirkungsgesetzes.

Die Schwierigkeiten, die der allgemeinen Anwendbarkeit einer derartigen Untersuchungsweise entgegenstehen, beruhen darauf, daß viele Reaktionen (und vor allem die nicht-ionogenen) zu kompliziert sind, um durch Verfolgung des zeitlichen Verlaufs ein einfaches Gesetz für die Reaktion finden zu können. Nach dem Massenwirkungsgesetz muß eine Reaktion zwischen zwei Stoffen, wenn das Gleichgewicht so liegt, daß praktisch die Rückreaktion außer acht zu lassen ist, folgender Gleichung genügen:

$$\frac{dx}{dt} = k\,(A - m\,x)^m\,(B - n\,x)^n,$$

wo x die Konzentration des entstehenden Reaktionsproduktes bedeutet, A die Anfangskonzentration des einen Reaktionsteilnehmers, B die Anfangskonzentration des anderen; m und n sind ganze Zahlen, die angeben, wieviel Moleküle von A und B an der Reaktion teilnehmen. In zahlreichen Fällen aber geht die Konzentration eines bzw. beider Reaktionspartner mit einer anderen Potenz in die Gleichung der Reaktionskinetik ein, als gemäß der Bruttogleichung der Reaktion zu erwarten wäre. (Innerhalb der Klammern wird natürlich m und n in jedem Fall durch die Bruttogleichung bestimmt.) Wir müssen in diesen Fällen annehmen, daß die Gesamtreaktion in eine größere Zahl von Teilreaktionen zerfällt, von denen eine als die langsamste allein die Reaktionsgeschwindigkeit der Gesamtreaktion bestimmt. Die Potenzen, mit denen die Konzentrationen der Reaktionsteilnehmer in die Gleichung der Reaktionskinetik eingehen, werden dann bestimmt durch die Zahl der Moleküle, mit der sie an dieser langsamsten Reaktion teilnehmen. So ist z. B. für die Reaktion

$$2HJ + H_2O_2 = J_2 + 2H_2O,$$

wie schon A. A. Noyes[8]) gefunden hat,

$$\frac{dx}{dt} = k\,(C_{H_2O_2} - x)\,(C_{HJ} - 2\,x)$$

und nicht

$$\frac{dx}{dt} = k\,(C_{H_2O_2} - x)\,(C_{HJ} - 2\,x)^2;$$

[8]) Ph. Ch. **18**, 131 (1895).

die Reaktion gehorcht also dem Gesetz für Reaktionen zweiter Ordnung, nicht dem für Reaktionen dritter Ordnung. Die Deutung, die Noyes diesem Befund gibt, ist, daß die Reaktion

$$H_2O_2 + 2HJ = 2H_2O + J_2$$

in die Teilreaktionen

$$H_2O_2 + HJ = HJO + H_2O$$

und

$$HJO + HJ = H_2O + J_2$$

zerfällt, von denen die zweite unmeßbar schnell verläuft, also nur die erste die Reaktionsgeschwindigkeit bestimmt. (Formuliert man die Gleichung, wie es wohl richtiger ist, als Ionen-Gleichung, so wird die Gesamtreaktion von fünfter Ordnung; sie zerfällt dann in eine langsame Reaktion zweiter Ordnung und eine unmeßbar schnelle von vierter Ordnung.) Ich konnte die experimentellen Befunde von Noyes bestätigen und will nur kurz erwähnen, daß die einfachste Methode zur Bestimmung der Reaktionsordnung[9]) der Vergleich der Anfangsgeschwindigkeiten bei verschiedenen Konzentrationen ist. In diesem Fall ist x so klein, daß es auf der rechten Seite der Gleichung vernachlässigt werden kann, und es wird dann entweder

$$v = k \cdot C_{H_2O_2} \cdot C_{HJ}$$

oder

$$v = k \cdot C_{H_2O_2} \cdot (C_{HJ})^2,$$

wo v die Anfangsgeschwindigkeit bedeutet. Es läßt sich natürlich sehr leicht bestimmen, ob v der ersten oder zweiten Potenz der HJ-Konzentration proportional ist; dagegen ist es bei den unvermeidlichen Versuchsfehlern manchmal nicht leicht entscheidbar, ob man bessere Konstanten für die Reaktion bei Anwendung des Reaktionsgesetzes zweiter Ordnung oder des Gesetzes dritter Ordnung bekommt.

Die Bestimmung der Potenzen, mit denen die Reaktionsteilnehmer in die Gleichung der Kinetik eingehen, läßt sich wohl stets ohne sonderliche Schwierigkeiten durchführen; eine viel größere Schwierigkeit beruht darauf, daß k die Funktion einer großen Zahl von Variabeln ist, deren Konstanterhaltung nicht immer möglich. Stets ist k eine Funktion der Temperatur — ich werde später darauf noch zurückkommen. Im Thermostaten läßt sich aber selbst bei Reaktionen mit erheblicher Wärmetönung die Temperatur leicht konstant halten[10]). Und nach-

[9]) Vgl. W. Nernst, „Theoretische Chemie" 6. Aufl. 1909 S. 566.

[10]) Über absichtlich adiabatisch geleitete Reaktionen und die Bestimmung von k aus der Temperaturerhöhung vgl. G. Bredig und F. Epstein, Z. f. anorgan. Chemie **42**, 341 (1904).

dem vor allem durch die Arbeiten von S. P. L. Sörensen[11]) und L. Michaelis[12]) erkannt worden ist, wie groß der Einfluß der aktuellen Acidität auf die Reaktionsgeschwindigkeit fast aller biologischen Vorgänge, aber auch auf die vieler anderer Reaktionen ist, kann man durch Anwendung sogenannter Puffer (vorwiegend Gemische schwacher Säuren mit ihren Alkalisalzen) die Wasserstoff-ionen-konzentration des Reaktionsgemisches während des Reaktionsverlaufes ebenfalls weitgehend konstant halten. Eine weitere Variable, von der zumeist in recht beträchtlichem Maße k abhängig zu sein pflegt, ist die Art und Konzentration von Neutralsalzen[13]); diese Variable pflegt während der Versuchsdauer konstant zu bleiben. Trotzdem ist zu bedenken, daß Resultate und Gesetzmäßigkeiten, die bei einer gewissen Temperatur, einer gewissen Wasserstoff-ionen-konzentration und in Gegenwart einer gewissen Menge eines Neutralsalzes gewonnen worden sind, nur gerade für diese Versuchsbedingungen Gültigkeit haben. Es kann sehr wohl sein, daß bei anderen Versuchsbedingungen andere Gesetzmäßigkeiten herrschen. Deswegen muß man sich davor hüten, aus Gesetzmäßigkeiten, deren Gültigkeit nicht für einen großen Bereich von Reaktionsbedingungen erwiesen ist, allzu weitgehende Schlüsse zu ziehen.

Eine schwer ausschaltbare Schwierigkeit, die mir aber bei meinen Untersuchungen nicht begegnet ist, beruht darauf, daß manchmal im Verlaufe der Reaktion Stoffe entstehen, die beschleunigend oder hemmend auf die Reaktion wirken. Auch in solchen Fällen positiver bzw. negativer Autokatalyse ist versucht worden, Gleichungen der Reaktionskinetik aufzustellen[14]). Es sei auch daran erinnert, daß die bekannte Schützsche Regel ein Näherungsaussdruck für Reaktionen ist, die durch das entstehende Reaktionsprodukt gehemmt werden. Eine Methode, um in derartige Verhältnisse Einblick zu gewinnen, ist, dem Reaktionsgemisch von vornherein die Reaktionsprodukte zuzusetzen.

Bei den von mir untersuchten Reaktionen entstanden dadurch schwierige Verhältnisse, daß ein die Reaktion beschleunigender Katalysator während der Reaktion Veränderungen, hauptsächlich Schädigungen, erleidet. Man kann zwar auch für diesen Fall zwei Differentialgleichungen aufstellen, eine für den Inaktivierungsvorgang und eine für die Reaktion selber; die Integration dieser Gleichungen führt aber auf sehr komplizierte Exponentialgleichungen, deren exakte Auswertung im allgemeinen Fall nicht möglich ist. Nur unter besonderen Bedingungen

---

[11]) Bio.Z. **21**, 131 (1909).
[12]) „Die Wasserstoff-ionen-konzentration", Berlin 1914, 2. Aufl. 1922.
[13]) Vgl. G. Grube und G. Schmidt, Ph. Ch. **119**, 19 (1926).
[14]) R. Kuhn in C. Oppenheimer, „Die Fermente und ihre Wirkungen", Leipzig 1925, § 101.

wird es durchführbar sein, sowohl die Konstante der Inaktivierung wie die der eigentlichen Reaktion berechnen zu können. Es ist eben in diesem Fall nicht möglich, sämtliche Variablen, deren Funktion k ist, während der Reaktion konstant zu halten, und aus diesem Grunde erhält man keine wirkliche Geschwindigkeitskonstante, so daß sich einer theoretischen Auswertung der gefundenen Zeit-Umsatzwerte große Schwierigkeiten entgegenstellen. Daher ist es bei den von mir untersuchten peroxydatischen und katalatischen Reaktionen nicht möglich, für alle Versuchsbedingungen von vornherein den nach einer gewissen Zeit erreichten Umsatz zu berechnen. Wollte man in Ermangelung einer mathematischen Formel auf graphischem Wege eine Lösung des Problems suchen, so käme man auch nicht zum Ziel. Da der Umsatz eine Funktion folgender 8 Variabeln ist (Reaktionsdauer, H_2O_2-Menge, KJ-Menge, Verdünnung, Temperatur, Katalysatormenge, pH, Neutralsalzkonzentration), so benötigt man eine neundimensionale Mannigfaltigkeit zur vollständigen Beschreibung der Verhältnisse. Wenn man unter Konstanterhaltung aller anderen Variablen die Abhängigkeit des Umsatzes von einer einzigen Variablen untersucht, so gewinnt man dadurch eine Schnittlinie zwischen einer Ebene (gekennzeichnet durch die angewandten Bedingungen) und der erwähnten neundimensionalen Mannigfaltigkeit. Aber selbst durch eine sehr große Zahl von solchen Schnittlinien wird man nur recht oberflächlich über die Eigenschaften dieser komplizierten Funktion unterrichtet werden. Wenn man die Art des Neutralsalzes ändern würde, so würde man eine neue, eben so komplizierte Mannigfaltigkeit erhalten, desgleichen bei Verwendung eines anderen Peroxyds bzw. einer anderen dehydrierbaren Substanz. Es sei übrigens erwähnt, daß die 8 Variablen in zwei Gruppen zerfallen. Ließe sich das Massenwirkungsgesetz anwenden, so würden die ersten vier Variablen in die Gleichung der Reaktionsgeschwindigkeit als solche eingehen, während die zweiten vier Variablen die Größe der Konstante bestimmen würden.

Es erhebt sich übrigens in den Fällen, wo die Wirksamkeit eines Katalysators allmählich nachläßt, und zu diesen zählten alle von mir untersuchten Reaktionen, die Frage, ob man dann noch von katalytisch beschleunigten Reaktionen oder nicht besser von induzierten Reaktionen reden soll. Nach der üblichen Definition[15]) soll ein echter Katalysator durch die katalytische Reaktion nicht verändert werden und stets gleichbleibende Wirksamkeit zeigen. Bei induzierten Reaktionen pflegen ge-

---

[15]) Siehe z. B. K. A. Hofmann, „Lehrbuch der anorg. Chemie“ 1917 S. 67 unten; auf S. 68 werden übrigens die Begriffe Katalase und Peroxydase miteinander verwechselt.

wöhnlich nur wenige Moleküle Akzeptor durch ein Molekül Induktor verändert zu werden. Wenn aber durch ein Molekül eines Stoffes viele Hunderte Moleküle eines anderen zur Reaktion gebracht werden, so kann man nach meiner Meinung, auch wenn die Wirksamkeit allmählich abklingt, ruhig von einer Katalyse reden[16]), vor allem wenn der maximale Umsatz nicht nur von der Menge Katalysator, sondern auch von den Reaktionsbedingungen, die man anwendet, abhängig ist. Man hat dann eben kein ideales Wirkungsmilieu für den Katalysator; vielleicht würde man in noch verdünnteren Lösungen eine Katalyse mit gleichbleibender Wirksamkeit finden.

Zu den bisher erwähnten Schwierigkeiten der theoretischen Auswertung reaktionskinetischer Resultate, die sich bei der Untersuchung der katalatischen Wirkung des Hämins ergeben, kommen bei der Untersuchung der peroxydatischen Wirkungen des Hämins noch neue hinzu. Neben der peroxydatischen Beschleunigung der Reaktion $H_2O_2 + 2HJ = 2H_2O + J_2$ durch Hämin verlaufen nämlich gleichzeitig noch drei andere Reaktionen[17]) (Leerreaktion der J_2-Bildung, Katalase durch Jod-ion, Katalase durch Hämin), die alle ebenfalls H_2O_2 verbrauchen und daher eine auch nur annähernde Berechnung der Konstanten der peroxydatischen Häminwirkung unmöglich machen.

C. Bestimmung der Gleichgewichtslage.

Günstig ist es, daß sowohl die Reaktion $2H_2O_2 = 2H_2O + O_2$, als auch die Reaktion $H_2O_2 + 2HJ = 2H_2O + J_2$ praktisch vollständig verlaufen, und eine Rückreaktion nicht zu berücksichtigen ist. Das Gleichgewicht liegt in beiden Fällen bei den angewandten Versuchsbedingungen vollständig zugunsten der rechten Seiten der Gleichungen. Auf verdünnte Lösungen ist ja vorläufig trotz eines Versuches von K. F. Herzfeld[18]) das Nernstsche Theorem[19]) nur in den wenigsten Fällen anwendbar. Immerhin kann man aus der Nernstschen Näherungsformel[20])

$$\log k = -\frac{Q}{4{,}57\,T} + \Sigma\nu \cdot 1{,}75 \log T + \Sigma\nu C$$

[16]) Die entgegengesetzte Ansicht vertreten C. Engler u. R. O. Herzog, H. **59**, 327 (1909), in ihren Untersuchungen über Oxydasen.

[17]) Für niedriges pH wird die Geschwindigkeit der Katalase durch Jodion so gering, daß sie vernachlässigbar ist, während die beiden andern Nebenreaktionen bei allen Versuchsbedingungen nicht ausgeschaltet werden konnten.

[18]) K. F. Herzfeld u. K. Fischer, Z. f. Elektrochem. **28**, 460 (1922).

[19]) Über die Frage, ob für verdünnte Lösungen der 3. Wärmesatz überhaupt anwendbar, siehe W. Nernst, „Die theor. u. exper. Grundl. des neuen Wärmesatzes, 2. Aufl. 1924 S. 196.

[20]) W. Nernst, „Die theor. u. exper. Grundl. d. neuen Wärmesatzes" S. 113; siehe dort auch die Bedeutung der verwandten Bezeichnungen.

sehen, daß bei einer Reaktion mit großer positiver Wärmetönung und gleichbleibender Molekülzahl (bzw. abnehmender Molekülzahl) wenigstens bei nicht allzu hohen Temperaturen log k einen stark negativen Wert annimmt, denn $\Sigma\nu$ wird ja Null (bzw. negativ), und $\Sigma\nu$ C ist ja entweder eine kleine positive Zahl (oder auch negativ), da ja die Werte der chemischen Konstanten C alle nicht sehr weit von 3 verschieden sind. Die Wärmetönung der Reaktion $2H_2O_2 = 2H_2O + O_2$ ist 46 000 cal[21]), die der Reaktion $H_2O_2 + 2HJ = 2H_2O + J_2$ ist 65 600 cal[21]); hiernach kann man schätzen, daß die Gleichgewichtskonstanten bei 0° äußerst klein sind, nämlich bei der ersten Reaktion von der Größenordnung 10^{-40} und bei der zweiten von der Größenordnung 10^{-60}. Das sind natürlich Größen, die sich jeder experimentellen Prüfung entziehen; praktisch verlaufen eben die Reaktionen quantitativ von links nach rechts[22]).

D. Der Temperaturkoeffizient der Reaktionsgeschwindigkeit und die Aktivierungswärme.

Zwischen der Gleichgewichtskonstante einer Reaktion und der Geschwindigkeitskonstante, mit der die Reaktion sich vollzieht, besteht aber genau so wenig eine Beziehung wie zwischen der Wärmetönung einer Reaktion und ihrer Geschwindigkeit, eine Tatsache, die oft außer acht gelassen wird. Bis jetzt gibt es noch keinerlei Gesetz, das ähnlich wie das Nernstsche Theorem, das die Gleichgewichtskonstante aus thermischen Größen zu berechnen erlaubt, im voraus die Geschwindigkeitskonstante zu bestimmen ermöglicht. Dagegen ist aber von Sv. Arrhenius[23]) eine Formel aufgestellt worden, die entsprechend der van t'Hoffschen Isochore eine Beziehung zwischen der Temperaturfunktion der Geschwindigkeitskonstante und der sogenannten Aktivierungswärme herstellt. Unter Aktivierungswärme ist die Arbeit zu verstehen, die notwendig ist, um die Moleküle in einen reaktionsbereiten Zustand zu versetzen. (Es sind ja bekanntlich nur ein kleiner Teil aller Molekülzusammenstöße erfolgreich; die ungleiche Verteilung der Wärmeenergie bedingt, daß immer einige Moleküle eine hohe Energie besitzen; die Zusammenstöße dieser Moleküle führen dann zur Umsetzung.) Die Aktivierungswärme ist nun nicht direkt meßbar,

---

[21]) Die zur Berechnung der Wärmetönungen notwendigen Daten sind dem Landolt-Börnstein, 5. Aufl., entnommen.

[22]) Durch Katalysatoren wird die Gleichgewichtskonstante nicht verändert. Über Stoffe, die gleichzeitig katalytisch wirken und das Gleichgewicht verschieben und deswegen streng genommen nicht als Katalysatoren zu bezeichnen sind, vgl. N. Schlesinger, B. **59**, 1965 (1926).

[23]) Ph. Ch. **4**, 226 (1889).

und man benutzt umgekehrt die Temperaturfunktion der Geschwindigkeitskonstante, um die Aktivierungswärme zu berechnen. Es ist

$$A = \frac{\log k_2 - \log k_1}{0{,}4343} \cdot R \frac{T_2 \cdot T_1}{T_2 - T_1},$$

wo A die Aktivierungswärme bedeutet, T_1 und T_2 zwei verschiedene absolute Temperaturen ($T_2 > T_1$), k_1 und k_2 die dazugehörigen Geschwindigkeitskonstanten und R die Gaskonstante. Die Bestimmung der Aktivierungswärme setzt also die genaue Kenntnis der Geschwindigkeitskonstanten bei mindestens zwei verschiedenen Temperaturen voraus; da ich in den von mir untersuchten Fällen diese nicht besaß, so konnte ich leider nicht die Aktivierungswärmen berechnen. Es wäre sehr wichtig, wenn man für eine durch verschiedene Katalysatoren beschleunigte Reaktion in jedem Fall die Aktivierungswärme berechnen könnte. (Es muß natürlich unbedingt darauf geachtet werden, daß man den wahren Temperaturkoeffizienten der Geschwindigkeitskonstante erfaßt und nicht etwa einen, der durch Schädigung des Katalysators bei höherer Temperatur oder durch Veränderung der Dissoziationskonstante der Katalysator-Substratverbindung verfälscht ist. Die Reaktionsgeschwindigkeitskonstante ist ja nicht der Konzentration des Katalysators selbst proportional, sondern der dieser Katalysator-Substratverbindung, die gleich $\frac{a-x}{a-x+k} \cdot \varphi$ ist, wo a—x die jeweilige Konzentration an Substrat bedeutet, φ die Katalysatormenge, und k die Dissoziationskonstante; nur bei sehr kleinem k nähert sich dieser Ausdruck dem Werte φ. Es läßt sich aber durch besondere Versuche k bestimmen und in besonders günstig gelegenen Fällen sollte es möglich sein, den wahren Temperaturkoeffizienten der Reaktionsgeschwindigkeit auch bei katalysierten Reaktionen zu finden.) Wenn man sich nämlich das Bild[24]) macht, daß auch bei einer energieliefernden Reaktion sich diese derart vollzieht, daß in einer ersten energieverbrauchenden Phase die Reaktionsteilnehmer auf ein höheres Energieniveau gehoben werden, von dem dann in zweiter Phase der energieliefernde Abfall zu einer unter dem ursprünglichen Niveau liegenden Höhe, der der Reaktionsprodukte, stattfindet, so bedeutet die Verschiedenheit der Aktivierungswärmen bei der Verwendung zweier Katalysatoren, daß die Reaktion in beiden Fällen einen verschiedenen Verlauf nimmt[25]). Der

[24]) W. Ostwald hat die Verhältnisse mit einem labilen Gleichgewicht eines Balkens verglichen, wo es auch einer gewissen Arbeit bedarf, um den Balken in Kippstellung zu bringen.

[25]) Diese Überlegungen gelten natürlich auch für den Vergleich von unkatalysierter und katalysierter Reaktion. Ein interessantes Beispiel für die

Katalysator wäre also nicht, wie es zumeist getan wird, mit einem die Widerstände herabsetzenden Schmiermittel zu vergleichen, sondern mit einem Bergführer, der eine Gebirgsüberschreitung durch das Aufzeigen eines günstigen, sonst unzugänglichen Passes verkürzt. Leider liegen aber die Dinge bei den Katalysatoren, die ich untersucht habe, zu kompliziert, um heute schon diese Frage beantworten zu können, die sehr wichtig für die Theorie der Katalyse ist. Ich habe mich deshalb bei meiner Arbeit vor allem auf die Sammlung von Erfahrungsmaterial beschränken müssen, und auch die von mir aufgefundenen Beziehungen zwischen katalytischer Wirksamkeit und Konstitution des Katalysators sind vorläufig mehr qualitativer als quantitativer Natur.

II. Kapitel.

Theorien über katalysierte Reaktionen.

A. Oberflächenkatalysen und reaktionsteilnehmende Katalysatoren.

Bevor ich auf die Frage der Beziehungen zwischen chemischer Konstitution und katalytischer Wirksamkeit eingehe, will ich noch kurz einige Vorstellungen über den Wirkungsmechanismus der Katalysatoren streifen. So zahlreich die Arbeiten über katalytisch beschleunigte Reaktionen sind, so gering sind auch heute noch unsere Kenntnisse vom Wesen der Katalyse; es gilt auch heute noch das von G. Bredig[26]) geprägte Bild: „Der Erdteil der Katalyse gleicht Australien, an der Küste blühende Städte und reiche Zivilisation, im Innern weite Strecken unerforschten Landes."

Neben der, sich an äußere Merkmale haltenden Einteilung in heterogene und homogene Katalyse (die Ferment-Katalyse kann als zwischen beiden stehende mikro-heterogene Katalyse gemäß der Kolloidnatur der Fermente angesehen werden) ist eine andere, sich an die Wir-

---

Tatsache, daß die Art des Katalysators auch auf den Verlauf einer Reaktion von Einfluß sein kann, ist die Arbeit von E. Ott u. R. Schröter, B. **60**, 624 (1927) über die Halbhydrierung von Acetylenen. Je nach der Art des Katalysators ändern sich die Ausbeuten an den beiden möglichen cis-trans-isomeren Äthylenkörpern. Die Tatsache, daß eine größere Wirksamkeit des Katalysators die Bildung der energiereichen Form begünstigt, steht im Einklang mit der Ostwaldschen Stufenregel, nach der bei schnell verlaufenden Reaktionen primär die energiereicheren Formen entstehen.

[26]) Bio.Z. **6**, 383 (1907).

kungsweise der Katalysatoren haltende möglich. So unterscheidet z. B. O. Warburg[27]) unspezifische Oberflächenkatalyse und spezifische chemische Katalyse. Bei der ersten Art von Katalyse wird die Konzentration der Reaktionsteilnehmer durch Absorptionskräfte am Katalysator erhöht, und dadurch die Reaktionsbeschleunigung bewirkt, während im zweiten Fall der Katalysator durch intermediäre Teilnahme an der Reaktion die Beschleunigung hervorruft. In manchen besonders einfach gelagerten Fällen können wir uns sogar weitgehend präzisierte Vorstellungen über die Art der Zwischenreaktionen machen, z. B. bei den von W. Langenbeck[28]) untersuchten Dehydrierungen von Aminosäuren in Gegenwart von Isatin, wobei intermediär Isatyd entsteht, von dem dann der Wasserstoff an das Methylenblau übertragen wird. Es ist, damit eine wirkliche Katalyse und nicht nur eine induzierte Reaktion stattfindet, in allen diesen Fällen notwendig, daß die Reaktionsfolge eine derartige ist, daß der Katalysator immer wieder zurückgebildet wird. Selbstverständlich muß auch die Reaktionsgeschwindigkeit der verschiedenen Teilreaktionen so groß sein, daß trotz ihrer Zwischenschaltung eine Vergrößerung der Gesamtreaktionsgeschwindigkeit statt hat. In den meisten Fällen wird wohl die heterogene Katalyse in erster Linie Oberflächenkatalyse, und die homogene Katalyse spezifische Katalyse sein, und nur bei der letzten Art von Katalyse wird man eine Veränderung der Aktivierungswärme erwarten können. Ob es aber überhaupt eine Katalyse gibt, bei der nur Oberflächenkräfte und keinerlei chemische Kräfte mitwirken, ist wohl noch sehr fraglich. Nach O. Ruff[29]) muß man ja auch für die Absorptionserscheinungen chemische Kräfte verantwortlich machen, und zweifelsohne erleiden die absorbierten Stoffe bei der Absorption gewisse Veränderungen, evtl. Deformationen der Elektronenhüllen im Sinne von K. Fajans[30]) (siehe z. B. die Silbertitrationsmethode mit absorbierten Farbstoffen[31]). Jedenfalls liegen die Verhältnisse bei den heterogenen Katalysen sehr kompliziert, denn die verschiedenen Momente, wie Teilchengröße, Kristallstruktur und Ionenbeladung[32]), spielen bei ihnen zweifelsohne eine sehr

---

[27]) Bio.Z. **119**, 134 (1921) und Z. f. El. Chem. **28**, 70 (1922).
[28]) B. **60**, 930 (1927).
[29]) B. **60**, 426 (1927).
[30]) Naturwissenschaften **11**, 165 (1923).
[31]) K. Fajans u. O. Hassel, Z. f. El. Chem. **29**, 495 (1924) und K. Fajans u. H. Wolff, Z. f. anorg. Chem. **137**, 221 (1924).
[32]) Eine Übersicht über die Probleme der heterogenen Katalyse gab A. Mittasch, B. **59**, 13 (1926) und noch umfassender W. Frankenburger, Z. f. angew. Chemie, **41**, 523 u. 561 (1928). — Als Beispiel dafür, daß durchaus nicht nur die Teilchengröße die katalytische Wirksamkeit beeinflußt, kann die Untersuchung von St. Ruszynak (Ph. Ch. **85**, 691, 1913)

große Rolle. Rein formale Konstruktionen über die Wirkungsweise heterogener Katalysatoren, wie z. B. die von J. Alexander[33]), sind wohl vorläufig noch wenig fruchtbringend. Es scheint aussichtsreicher, vorerst die homogenen Katalysen zu untersuchen. Vielleicht gelingt es bei ihnen, zwischen Konstitution des Katalysators und seiner katalytischen Wirksamkeit eine Beziehung aufzudecken.

B. Zusammenhänge zwischen Katalyse und Konstitution.

In der vorliegenden Arbeit wurden verschiedene, zum Teil einander sehr nahestehende Derivate des Blutfarbstoffs auf ihre peroxydatischen und katalatischen Wirksamkeiten untersucht, und es stellte sich heraus, daß sehr prägnante Unterschiede zwischen den einzelnen untersuchten Stoffen bestehen. Von größtem Einfluß ist ein Austausch des Eisens gegen Mangan in den Porphyrin-Metallkomplexverbindungen, aber auch Änderungen, die nur den Porphyrinteil des Moleküls betreffen, wirken sich sehr deutlich aus. Man muß also annehmen, daß die Konstitution des Gesamtmoleküls von Einfluß auf die katalytische Wirksamkeit ist. Um evtl. zu entscheiden, welche Atomgruppen für die katalytische Wirksamkeit unerläßlich sind, und welche Gruppen einen diese Wirksamkeit stärkenden Einfluß ausüben — ähnlich den Begriffen chromophore und auxochrome Gruppen in der Farbstoffchemie —, habe ich eine große Zahl einfacherer organischer und anorganischer Eisenverbindungen auf ihre katalytischen Wirkungen hin untersucht. Trotz eifrigsten Bemühens habe ich jedoch bisher keine finden können, die in ihren peroxydatischen oder katalatischen Wirkungen den Blutfarbstoffderivaten[34]) gleichgekommen wären; alle untersuchten Verbindungen waren unter den angewandten Reaktionsbedingungen so gut wie wirkungslos.

---

dienen, der fand, daß bei Goldsolen wechselnder Dispersität die Hydroperoxyd zersetzende Kraft mit zunehmendem Verteilungsgrade abnimmt. Wahrscheinlich variiert in diesem Fall die Natur der aufladenden Komplexionen, vgl. z. B. W. Pauli (Koll. Ztschr. **28**, 49, 1921) und vor allem auch R. Kuhn in C. Oppenheimers „Handbuch der Fermente", Leipzig 1924, Bd. I, 165.

[33]) Science **65**, 62 (1927).

[34]) Siehe die später bei dem Kapitel über die Konstitution des Hämins diskutierte Frage, ob evtl. eine anormale Valenzstufe des Eisens in den Blutfarbstoffderivaten diese ungewöhnliche katalytische Wirksamkeit bedingt.

III. Kapitel.

Theorien der biologischen Oxydationsprozesse.

A. Die Möglichkeiten der Teilnahme des Oxyhämoglobins an peroxydatischen Reaktionen.

Die besondere Eignung der Blutfarbstoffderivate als Katalysatoren ist deswegen erstaunlich, weil ja nach unseren bisherigen physiologischen Kenntnissen der Blutfarbstoff im Organismus keinerlei katalatische noch peroxydatische Wirksamkeit entfaltet. (Übrigens besitzt ja auch nicht das Hämoglobin, sondern nur das Hämin bzw. Hämatin, das ja unter normalen Bedingungen nicht im Organismus vorkommt, katalatische Wirksamkeit.) Im Organismus kommt dem Blutfarbstoff vor allem die Aufgabe des Sauerstoff-Transportes zu; durch das Vermögen bei größerem Sauerstoffdruck eine Additionsverbindung mit dem Sauerstoff, das Oxyhämoglobin, zu bilden, die bei niederem Sauerstoffdruck wieder in Hämoglobin und Sauerstoff dissoziiert, wird die Aufgabe der Versorgung der Zellen, die als Orte der biologischen Verbrennungen anzusehen sind, mit dem notwendigen Sauerstoff in sehr vollkommener Weise gelöst. Über das Wesen der in den Zellen stattfindenden Verbrennungsvorgänge wissen wir noch sehr wenig. Es ist wahrscheinlich, daß Eisen in ganz besonderer Bindungsform — das sogenannte Atmungsferment Warburgs[35]) — wesentlich dabei mitwirkt, doch ist anzunehmen, daß überdies zum Zustandekommen der biologischen Verbrennung noch spezielle dehydrierende Fermente notwendig sind. Dem Blutfarbstoff selbst scheint bei den Oxydationsvorgängen keinerlei Rolle zuzukommen; das ist auch verständlich, denn er besitzt in erster Linie nur peroxydatische Eigenschaften[36]). Und es ist ja

---

[35]) B. **58**, 1001 (1925).

[36]) Die einzigste Angabe in der Literatur, die auch oxydische Eigenschaften des Blutfarbstoffs beschreibt, ist F. E. Robinson, Biochem. Journ. **18**, 255 (1924). Robinson verwendet als Substrat Linolensäure (Leinöl), die sich ja durch besonders leichte Oxydierbarkeit auszeichnet. Die Annahme, daß sich zuerst ein Peroxyd der Linolensäure bildet und daß dann eine durch den Blutfarbstoff katalysierte peroxydatische Reaktion einsetzt, hält R. in anbetracht der Kinetik der Reaktion für unwahrscheinlich; bei der Beschleunigung der Linolensäureoxydation durch Metalloxyde, bei der ein derartiger Mechanismus angenommen wird, hat die Kinetik die Form einer Sinuskurve, die aber bei Anwendung von Blutfarbstoff als Katalysator auch nicht einmal andeutungsweise zu finden ist. Die von H. Gaffron (Naturwissenschaften **13**, 859, 1925 und B. **60**, 762, 1927) gemachte Beobachtung, daß Hämatoporphyrin photochemische Oxydationen beschleunigt, hat nicht direkt hiermit

überhaupt noch fraglich, ob bei den biologischen Oxydationen intermediär Hydroperoxyd gebildet wird, wenn auch nach der Wielandschen Dehydrierungstheorie bei allen Dehydrierungen, bei denen molekularer Sauerstoff als Akzeptor fungiert, primär H_2O_2 entstehen soll; es ist aber sehr leicht möglich, daß bei den biologischen Oxydationen nur oder wenigstens vorwiegend aktivierter Sauerstoff als Wasserstoffakzeptor fungiert, und daß dieser sofort bis zur Stufe des Wassers hydriert wird[36a]). Andererseits besteht eine gewisse Möglichkeit, daß H_2O_2 bei der Hydrolyse organischer Peroxyde (bzw. von Eisenperoxyd) gebildet wird, wenn auch die Existenz solcher Peroxyde als Zwischenstufe der biologischen Oxydationen noch sehr hypothetisch ist. Aber selbst wenn intermediär geringe Mengen Hydroperoxyd gebildet würden, so würden sie durch die überall reichlich vorhandene Katalase zersetzt werden[37]), und das nicht sehr stark peroxydatisch wirksame Oxyhämoglobin würde wohl kaum zur Ausübung seiner peroxydatischen Wirksamkeit kommen. Außerdem werden ja durch peroxydatisch aktiviertes Wasserstoffsuperoxyd geringer Konzentration vorwiegend nur aromatische Amino- und Oxygruppen[38]) dehydriert und nicht die eigentlichen Brennstoffe der Zelle, Kohlehydrate und Fette. Wohl der einzige

---

etwas zu tun; es scheint sich dabei um eine, den meisten fluoreszierenden Farbstoffen zukommende Eigenschaft zu handeln, die völlig unabhängig von einem etwaigen Eisengehalt des Moleküls ist. (Hämatoporphyrin ist eisenfrei!) Über eine neuerdings beobachtete Erhöhung der katalytischen Wirksamkeit fluoreszierender Farbstoffe durch gleichzeitig anwesende Schwermetall-ionen vgl. K. Noack, Bio.Z. **183**, 153 (1927). Ferner sei hier auch noch auf die in Fußnote 44 S. 16 erwähnte Beobachtung D. C. Harrisons hingewiesen, daß die Oxydation von Cystein durch Luft durch Hämin eine gewisse Beschleunigung erfährt, wenn auch in geringerem Ausmaße als durch die äquivalente Menge ionogenen Eisens und auf die Angabe W. Heubners (Naturwissenschaften **16**, 515, 1928), daß die Oxydation von Hydrochinon durch Luftsauerstoff durch Hämoglobin beschleunigt wird.

[36a]) Vgl. auch L. Stern (Bio.Z. **189**, 139, 1927), wo Fermente, die O_2 bis zur Stufe des H_2O hydrieren, Oxydone genannt werden im Gegensatz zu den Oxydasen, die O_2 nur bis zur Stufe des H_2O_2 hydrieren.

[37]) Aus diesem Grund ist es bisher auch nur in aeroben Kulturen von Anaerobiontikern, die keine Katalase besitzen, gelungen, Hydroperoxyd nachzuweisen (z. B. I. W. Mac Leod u. J. Gordon, Biochem. Journ. **16**, 499, 1922). Es ist zwar naheliegend, aus dem reichlichen Vorkommen von Katalase bei allen Aerobiontikern zu schließen, daß bei ihnen durch Hydrierung des Sauerstoffs primär Hydroperoxyd entsteht, das dann durch die Katalasen unter Rückgewinnung der halben Sauerstoffmenge zersetzt wird; doch muß man ja bei allen teleologischen Schlüssen äußerst vorsichtig sein. In vitro haben H. Wieland u. F. G. Fischer (B. **59**, 1180, 1926) bei Dehydrierungen durch Oxydasen Hydroperoxyd nachweisen können.

[38]) Außerdem werden durch peroxydatisch aktiviertes H_2O_2 noch Ameisensäure und Jodwasserstoff oxydiert; beide Reaktionen werden zu analytischen Zwecken benutzt, dürften aber biologisch nicht in Betracht kommen.

von allen biologischen Oxydationsvorgängen, bei dem evtl. der Blutfarbstoff mitwirken könnte, wäre die Pigmentbildung, doch scheint für diese nach den Untersuchungen von B. Bloch[39]) ja ein spezifisches Ferment, die Dopa-oxydase, verantwortlich zu sein.

Es können also die von mir untersuchten peroxydatischen und katalatischen Wirkungen der Blutfarbstoffderivate nicht beanspruchen, irgendwelche biologische Bedeutung zu haben[39a]). Es sind reine Modellversuche, und ich bin mir bewußt, daß es nicht ohne weiteres zulässig ist, aus Modellversuchen auf irgendwelche biologischen Vorgänge zu schließen. So ist nach meiner Meinung auch von allen Versuchen Warburgs[40]) der erste, wo er atmendem See-igel-eierbrei Eisen zusetzt und dadurch eine Erhöhung der Atmung bewirkt, der überzeugendste für seine Annahme, daß Eisen ein wesentlicher Bestandteil des Atmungsfermentes ist, während sich gegen seine späteren Modellversuche manche Einwände erheben lassen.

B. Die wichtigsten Grundzüge der verschiedenen Oxydationstheorien.

Es würde den Rahmen dieser Arbeit weitaus überschreiten, wenn ich hier auf alle Theorien, die für die biologischen Oxydationsprozesse aufgestellt worden sind, eingehen würde. In einer ungemein großen Zahl von Arbeiten ist ein riesiges Beobachtungsmaterial niedergelegt worden, von dem zwar vielleicht ein Teil schärfster Kritik nicht standhält, da ja die recht komplizierten Verhältnisse, die vor allem beim Arbeiten mit überlebendem Gewebe vorliegen, leicht Veranlassung zur Außerachtlassung irgendeines der zahlreichen, die Gesamtverhältnisse beeinflussenden Faktoren geben und auf diese Weise Fehlschlüsse hervorrufen. Aber selbst nach dieser Einschränkung ist das experimentelle Material noch so groß und sich zum Teil widersprechend, daß es sehr schwierig ist, eine Theorie aufzustellen, die befriedigend alle Erfahrungstatsachen erklärt. Von älteren Theorien sei vor allem die Engler-Bachsche[41]) genannt. Ihre Hauptidee ist, daß die Zelle über Stoffe verfügt, die leicht Moloxyde bzw. Peroxyde bilden, die sogenannten Oxygenasen; in einer zweiten Phase würden dann unter Oxydation der eigentlichen Brennstoffe der Zelle die Oxygenasen aus den Peroxyden zurückgebildet. Solange man die sogenannten Oxy-

[39]) H. **94**, 226 (1917).
[39a]) Vgl. aber dazu das Nachwort S. 153.
[40]) H. **92**, 231 (1914).
[41]) Zusammenfassende Darstellung A. Bach, Oxydationsprozesse in der lebenden Substanz, Handb. d. Biochem., Ergänzungsband, Jena 1913.

genasen[42]) nicht kennt, hat natürlich diese Annahme nur hypothetischen Wert; sie muß damit rechnen, daß es sehr viel verschiedene Oxygenasen gibt; das große Gebiet der Oxydo-reduktionen kann sie nur mit sehr willkürlichen Hilfshypothesen erklären, von denen z. B. die der sogenannten Perhydride ganz ungemein unwahrscheinlich ist.

Die Wielandsche Dehydrierungstheorie[43]) hat gegenüber der Engler-Bachschen Theorie den Vorzug der Allgemeingültigkeit, des Auskommens ohne Zusatz-Hypothesen und der weitaus größeren Anschaulichkeit. Der organische Chemiker ist durch die zahlreichen Erfahrungen auf dem Gebiet der Desmotropie und Tautomerie mit der Tatsache der Leichtbeweglichkeit des Wasserstoffs bekannt, und es ist für ihn sehr einleuchtend, daß bei den Oxydationsvorgängen primär eine Lockerung von Wasserstoffatomen stattfindet, die dann an den Stoff mit höherem Oxydationspotential abwandern. Für das gesamte Gebiet der Oxydoreduktionen und des anaerobiontischen Stoffwechsels genügt die Dehydrierungstheorie wohl allen Erfahrungstatsachen ohne jede Zusatzhypothese. Für den aerobiontischen Stoffwechsel und die Oxydationen unter Mitwirkung des Luftsauerstoffes erscheint mir das von O. Warburg beigebrachte experimentelle Material für den Beweis der Notwendigkeit einer besonderen Aktivierung des Sauerstoffs, bei der das Eisen wahrscheinlich eine große Rolle spielt, so gewichtig[44]), daß ich glaube, den Tatsachen wird am meisten eine von

---

[42]) Man kann evtl. die Leukoverbindungen der Palladinschen Atmungspigmente als solche Oxygenasen ansprechen; wenn aber, wie es wahrscheinlich ist, die Atmungspigmente Orthochinone oder Chinondiimine sind, so kann man sie auch sehr gut als Katalysatoren der Dehydrierung nach H. Wieland auffassen; sie würden dann ähnlich wirken, wie nach W. Langenbeck das Isatin bei der Dehydrierung von Aminosäuren.

[43]) Zusammenfassende Darstellung H. Wieland, Über den Mechanismus der Oxydationsvorgänge, Ergebn. d. Physiologie Bd. 20 S. 477 (1922).

[44]) Wenn es auch nach neueren Arbeiten von D. C. Harrison u. S. Thurlow (Bio. Chem. Journ. **20**, 217, 1926) und D. C. Harrison (Bio. Chem. Journ. **21**, 346, 1927) nicht ausgeschlossen scheint, daß dem Eisen eine andere Rolle zukommt als Warburg meint, nämlich nicht die Aktivierung des Sauerstoffs, sondern die von Sufhydryl-Gruppen enthaltenden Substraten. Andererseits hat es aber den Anschein, als ob die Oxydation des Cysteins gegenüber anderen Oxydationsvorgängen eine Sonderstellung einnimmt. So fand D. C. Harrison (Bio. Chem. Journ. **18**, 1009, 1924), daß die Oxydation des Cysteins durch Luftsauerstoff durch Hämin nur sehr wenig beschleunigt wird, weit weniger als durch die äquivalente Menge ionogenen Eisens, was im Gegensatz zu den von vielen anderen Autoren und auch von mir gemachten Beobachtung steht, daß den Blutfarbstoffderivaten eine weit höhere katalytische Wirksamkeit zukommt als der äquivalenten Eisenmenge in ionogener Form oder in irgendwelcher andern komplexen Bindungsform. Vgl. auch diese Arbeit S. 12 und S. 111—115.

C. Oppenheimer[45]) vorgeschlagene Synthese Wieland-Warburg gerecht, die Oppenheimer in folgende Worte fast: „Nur aktiver Wasserstoff geht an aktiven Sauerstoff als Akzeptor."

C. Die peroxydatischen Reaktionen.

Ein von der Wielandschen Dehydrierungstheorie schwer erklärbares Gebiet ist das der peroxydatischen Reaktionen. Von R. Willstätter und H. Weber[46]) ist für die Meerrettich-Peroxydase nachgewiesen worden, daß größere Mengen Hydroperoxyd reversibel hemmend wirken. Eine Erklärung für diese Tatsache, die mir ungezwungener erscheint als die Willstättersche Annahme, daß das Hydroperoxyd in verschiedenen tautomeren Formen reagieren kann, ist, daß das Enzym gemäß der Eulerschen Zwei-affinitäts-theorie[47]) sowohl mit dem Hydroperoxyd, als auch mit der zu oxydierenden Substanz eine Komplexverbindung bildet (bzw. beide an dem kolloidalen Fermentteilchen absorbiert werden), und daß durch einen zu großen Überschuß des Hydroperoxyds der andere Reaktionsteilnehmer gewissermaßen aus der wirksamen Sphäre verdrängt wird. Mich haben teils die Analyse der pH-Abhängigkeit der Leerreaktion zwischen Jodwasserstoff und Hydroperoxyd, teils die Untersuchung der Abhängigkeit der peroxydatischen Wirkung des Oxyhämoglobins von der Hydroperoxyd- und von der Jodkalium-Konzentration, ferner die Tatsache, daß Hämin sowohl katalatisch als auch peroxydatisch wirkt[48]), zu der Überzeugung gebracht, daß bei den peroxydatischen Katalysen unbedingt eine Wechselwirkung zwischen dem Katalysator und dem Hydroperoxyd besteht. Dies scheint mit einer streng durchgeführten Dehydrierungstheorie nicht vereinbar zu sein. Ich glauber aber, daß

---

[45]) C. Oppenheimer, „Die Fermente und ihre Wirkungen", Leipzig 1926, Bd. II S. 1310 oben, und auch C. Oppenheimer, Ch. Z. **49**, 991 (1926), wo vor allem auch die neueren Anschauungen R. Willstätters mitberücksichtigt werden.

[46]) A. **449**, 175 (1926).

[47]) H. v. Euler, Enzyme und Co-enzyme usw., Sammlg. chem. techn. Vorträge Bd. 28, Stuttgart 1926.

[48]) Die Annahme, daß Hämin eigentlich nur katalatisch wirke, und daß die peroxydatischen Wirkungen durch die oxydatischen Wirkungen von katalatisch gebildetem atomarem Sauerstoff vorgetäuscht werden, widerspricht den Erfahrungen anderer Autoren bei den Katalasen. Ausschließen läßt sich aber diese Möglichkeit kaum, da Hämin unter allen untersuchten Bedingungen stärker katalatisch als peroxydatisch wirkt. (Anders liegen die Verhältnisse bei dem Mesohämin, das nur unter besonderen Bedingungen, und dann auch nur recht schwach katalatisch wirkt, während es eine beträchtliche peroxydatische Wirksamkeit hat.)

H. Wieland selbst die Dehydrierungstheorie nicht in übertrieben dogmatischer Form angewandt wissen will. Die Tatsache, daß es Oxydasen gibt, die nur Sauerstoff, aber nicht Hydroperoxyd als Akzeptor des Wasserstoffs auszunützen verstehen[49]), andererseits aber Peroxydasen, die nur bei Gegenwart von Hydroperoxyd, aber nicht bei der von Sauerstoff oxydierend wirken können, beweist schon eindeutig, daß es Fermente gibt, die nicht nur spezifisch auf den Wasserstoffdonator, sondern auch spezifisch auf den Wasserstoffakzeptor eingestellt sind. Aus der zusammenfassenden Darstellung der Dehydrierungstheorie durch H. Wieland selbst will ich folgende Sätze, die ebenfalls diesen Standpunkt betonen, anführen[50]): „Denn allen Erfahrungen nach bezieht sich die spezifische Aktivierung der Fermente nicht nur auf das Substrat, dessen Wasserstoff aktiviert wird, sondern auch auf den Akzeptor." Speziell auf die Peroxydasen bezüglich[51]): „Der von der Dehydrierung erfaßte Wasserstoff wird hier spezifisch auf Hydroperoxyd abgeladen, während molekularer Sauerstoff als Wasserstoffakzeptor nicht dienen kann." Wie sich auch die Katalasen entsprechend erklären lassen, zeigt folgender Satz[52]): „Die Katalasen sind auf Grund ihrer Wirkung nichts anderes als Dehydrasen von ganz spezifischer Einstellung auf Substrat und Akzeptor, nämlich beiderseits auf Hydroperoxyd." Formal läßt sich also die Dehydrierungstheorie immer durchführen und ist schon aus diesem Grund allen andern Oxydationstheorien überlegen; der Reaktionsmechanismus ist aber auch nach der Meinung von H. Wieland in manchen Fällen keine reine Dehydrierung, sondern es muß ein spezifisches Zusammenwirken von Katalysator und Wasserstoffakzeptor hinzukommen. Solche spezifische Kombinationen sind z. B. Peroxydase-Hydroperoxyd und evtl. das eisenhaltige Atmungsferment — molekularer Sauerstoff.

D. Speziellere Vorstellungen.

Über Einzelheiten der Wirkungsweisen der peroxydatischen Katalysatoren kann man sich selbst in den von mir untersuchten Fällen, wo man die Konstitution des Katalysators recht weitgehend kennt, nur vermutungsweise ein Bild machen. Ich halte die Hypothese von W. Madelung[53]), daß die Blutfarbstoffderivate aus folgendem Grund den gewöhnlichen Eisenverbindungen als peroxydatische Katalysatoren

[49]) H. Wieland u. F. G. Fischer, B. **59**, 1180 (1926).
[50]) Ergebnisse d. Physiologie Bd. 20 (1922) S. 505.
[51]) Ergebnisse d. Physiologie Bd. 20 (1922) S. 508.
[52]) Ergebnisse d. Physiologie Bd. 20 (1922) S. 507.
[53]) H. **71**, 204 (1911).

überlegen sind, für recht einleuchtend: Ferroverbindungen wirken peroxydatisch durch intermediäre Bildung eines Peroxyds[54]; aus diesem würde aber nur zu einem geringen Teil die Ferrostufe, die erneut ein Peroxyd bilden könne, zurückgebildet, ein größerer Teil des Peroxyds ginge bei der Oxydation des Substrates in die Ferristufe über, die unwirksam sei. Aus diesem Grunde erkläre sich das schnelle Abklingen der peroxydatischen Katalysen mit Ferroeisen. Bei den Blutfarbstoffderivaten würde durch die komplexe Bindungsweise des Eisens die Bildung der inaktiven Form verhindert. Man hat hiergegen eingewandt, daß in den meisten Blutfarbstoffderivaten (z. B. dem Hämin) das Eisen nach unseren heutigen Anschauungen in der Ferristufe vorliegt. Es ist aber dieser Einwand nicht stichhaltig, denn es ist ja trotzdem möglich, daß das Hämin zur Bildung eines labilen und wirksamen Peroxyds befähigt ist, das immer wieder unter Rückbildung des ursprünglichen und wirksamen Katalysators zerfällt und dabei oxydierend wirkt[55]. Wie aber schon oben gesagt, können diese Vorstellungen nicht beanspruchen, mehr zu sein als Vermutungen. Ich wende mich jetzt einem anderen Fragenkomplex zu, nämlich dem der Konstitution des Hämins.

IV. Kapitel.

Die Konstitution des Hämins.

Die eingehende Beschäftigung mit den katalytischen Eigenschaften des Hämins und die Feststellung, daß schon geringfügige Veränderungen im Molekül diese Eigenschaften qualitativ und quantitativ sehr stark beeinflussen, haben mich dazu veranlaßt, mich auch mit dem Problem der Konstitution des Hämins zu befassen.

A. Das Dihydrohämin.

Die Auffindung des Dihydrohämins[56], die im Verlauf dieser Arbeit erfolgte, erscheint mir für eine ganze Reihe von Fragen der Blut-

[54]) Siehe später (S. 113) die neueren Anschauungen H. Wielands über die Wirkungsweise des Ferroeisens.

[55]) Die Erhöhung der peroxydatischen und katalatischen Wirksamkeit des Hämins durch Auflösung des Hämins in Pyridin könnte dann so erklärt werden, daß das Peroxyd der Hämin-Pyridinverbindung schneller oxydierend wirke als das Peroxyd des Hämins allein. Das raschere Abklingen der Katalyse durch Pyridin-Hämin wird vielleicht dadurch erklärt, daß der ursprüngliche Katalysator bei der Oxydation zu einem noch geringeren Bruchteile zurückgebildet wird, als beim Na_2HPO_4-Hämin. (Siehe auch nächstes Kapitel.)

[56]) Ein erheblicher Teil des experimentellen Materials, das diesem Ab-

farbstoffchemie bedeutungsvoll, und ich glaube, daß eine ungezwungene Erklärungsmöglichkeit für Bildung und Eigenschaften des Dihydrohämins zu den notwendigen Erfordernissen einer zutreffenden Hämin-formel gehören muß. Den theoretischen Erwägungen seien kurz die wichtigsten Daten der Gewinnung und Charakterisierung des Dihydrohämins [56a]) vorangestellt:

1. Die katalytische Hydrierung von Hämin unter Verwendung von Palladium- oder Platin-Kohle kommt nach Aufnahme von einem Mol Wasserstoff pro Mol Hämin zum Stillstand. Führt man die Hydrierung an Hämin, das in einem Gemisch von Pyridin und Chloroform gelöst ist [57]) (demselben wie man es zum Umscheiden des Hämins nach W. Küster [58]) verwendet) durch, so kann man durch Eingießen der Pyridin-Chloroform-Lösung in 100° heißen, mit Kochsalz gesättigten Eisessig das Hydrierungsprodukt kristallisiert erhalten.
2. Das so gewonnene Produkt gibt bei der Elementaranalyse und der Molekulargewichtsbestimmung Resultate, die keine Unterscheidung zwischen ihm, Hämin und Mesohämin erlauben, was ja bei dem großen Molekulargewicht nicht anders zu erwarten ist. Das Absorptionsspektrum des Dihydrohämins in 0,01%iger Pyridinlösung ist dasselbe wie das von Hämin, aber deutlich von dem von Mesohämin unterschieden. Zur genauen kristallographischen Bestimmung sind die Kristalle des zwar vollständig kristallisierten Produktes zu klein.
3. In seiner katalatischen Wirksamkeit ist das Dihydrohämin deutlich unterschieden sowohl vom Hämin als auch vom Mesohämin. Das Verhältnis der katalatischen Wirksamkeiten der

schnitt zugrunde liegt, ist gemeinsam mit Herrn Carl Seyffert, der meine Arbeit fortsetzt, gewonnen worden. Im experimentellen Teil finden sich nur die Belege über die von mir selbst ausgeführten Versuche.

[56a]) H. Fischer bestreitet in seiner Arbeit mit E. Walter (B. **60**, 1993, 1927) die Existenz des Dihydrohämins, doch scheinen mir seine Beweisgründe nicht zwingend. Weiteren experimentellen Untersuchungen bleibt die restlose Klärung des Sachverhaltes vorbehalten.

[57]) Auch NaOH gelöstes Hämin nimmt pro Mol Hämin ein Mol H_2 auf, aber es gelingt nicht, das Hydrierungsprodukt kristallisiert zu erhalten. Auch nicht, wenn man nach der Vorschrift von H. Fischer und H. Röse (H. **88**, 12, 1913) das mit Säure gefällte Hydrierungsprodukt zuerst in Alkohol löst, welches Verfahren diese Autoren beim mit Kaliummethylat reduzierten Hämin zu einem kristallisierten Produkt geführt hat. Die Frage, ob Hämin, nachdem es einmal in NaOH gelöst worden ist, wieder in kristallisiertes Hämin zurückverwandelbar ist, wird umstritten. O. Piloty (Dissertation Eppinger, München 1907) behauptet ja, W. Küster nein (H. **66**, 227, 1910); meine Erfahrungen stimmen mit denen Küsters überein.

[58]) H. **40**, 394 (1904).

drei Stoffe zueinander ist abhängig von den gewählten Versuchsbedingungen; in 75%igem Pyridin ist Mesohämin am wirksamsten, in wässeriger Lösung Hämin; das Dihydrohämin steht in beiden Fällen zwischen Hämin und Mesohämin, aber stets dem Hämin näher.

4. Bei der Bestimmung der aktiven Wasserstoffe nach Zerewitinoff[59]) ergeben sich beim Hämin und Mesohämin drei aktive Wasserstoffe[60]), beim Dihydrohämin aber fünf aktive Wasserstoffe, wodurch bewiesen wird, daß das Dihydrohämin nicht etwa ein Gemisch von Hämin und Mesohämin ist.

Zusammenfassend läßt sich über das Dihydrohämin sagen: Es unterscheidet sich vom Hämin durch den Mehrgehalt von zwei Wasserstoffen (1), die so addiert sein müssen, daß sie bei der Bestimmung nach Zerewitinoff als aktive Wasserstoffe in Erscheinung treten (4); in den meisten Eigenschaften stimmen Dihydrohämin und Hämin überein (2); neben der Zahl der aktiven Wasserstoffe sind Dihydrohämin, Hämin und Mesohämin am schärfsten voneinander unterscheidbar durch die Verschiedenheit der katalatischen Wirksamkeit (3).

Es stehen diese Befunde im Widerspruch zu den Angaben von H. Fischer und A. Hahn[61]), die meinen, bei der katalytischen Hydrierung von in NaOH gelöstem Hämin mit kolloidalem Palladium Mesohämin erhalten zu haben. Fischer und Hahn haben aber weder den Wasserstoffverbrauch gemessen noch das Hydrierungsprodukt kristallisiert erhalten. Die einzige Stütze für ihre Annahme ist der Befund, daß beim oxydativen Abbau des Hydrierungsproduktes kleine Mengen von Methyl-aethyl-malein-imid entstehen. Mesohämin kann nun nur durch Aufnahme von drei Mol Wasserstoff aus Hämin hervorgehen; nach den neueren Anschauungen von W. Küster[62]) und auch von F. Fischer[63]) sind nämlich die Seitenketten des Hämins dreifach ungesättigt. (Früher nahm man nur zwei Doppelbindungen[64]) in den Seitenketten an, von welcher Annahme man aber jetzt aus triftigen Gründen abgekommen ist, aber auch dann wäre mindestens die Aufnahme von zwei Mol Wasserstoff zur Mesohäminbildung notwendig.) Da nun bei der Hydrierung des Hämins immer und unter nahezu allen

[59]) B. **40**, 2023 (1907).

[60]) In Übereinstimmung mit H. Fischer u. J. J. Postowsky, H. **152**, 300 (1926).

[61]) H. **91**, 181 (1914).

[62]) W. Küster u. W. Heeß, B. **58**, 1022 (1925).

[63]) Zeitschr. f. angew. Chemie **38**, 981 (1925).

[64]) Siehe z. B. H. Fischer, Ergebn. d. Physiologie **15**, 227 (1916).

[65]) Über die „Perhydrohämin"-bildung bei Verwendung von PtO_2 als Katalysator und Piperidin-Chloroformgemischen als Lösungsmittel siehe S. 42.

Bedingungen[65]) nach der Aufnahme von 1 Mol Wasserstoff die Wasserstoffabsorption zum Stillstand gekommen ist, so erscheint es mir wenig wahrscheinlich, daß Fischer und Hahn das Hämin wirklich zur Stufe des Mesohämins hydriert haben. Andererseits kann man sich aber auch nicht vorstellen, wie beim oxydativen Abbau des Dihydrohämins Methyl-aethyl-malein-imid entstehen kann. Nun haben aber Fischer und Hahn zur Oxydation anstatt des meistangewandten Chromsäure-anhydrids Bleidioxyd angewandt; vielleicht kann durch dieses bzw. durch das bei der Oxydation entstehende basische Bleioxyd unter gewissen Umständen in geringem Maße eine Decarboxylierung der Hämatinsäure zum Methyl-aethyl-malein-imid bewirkt werden. Es fehlen übrigens bei Fischer und Hahn Angaben über die Mengen des isolierten Methyl-aethyl-malein-imids; es wird nur angeführt, daß die Identifikation durch Schmelzpunkt und Mischschmelzpunkt erfolgte. Bemerkenswert ist übrigens auch, daß Fischer und Hahn bei Enteisenung des Hydrierungsproduktes mit Eisessig-Bromwasserstoff nicht ein mit Mesoporphyrin identisches Porphyrin erhalten haben, wie zu erwarten wäre, wenn das Hydrierungsprodukt Mesohämin wäre.

Es fehlen leider nicht nur bei den Hydrierungsversuchen von Fischer und Hahn die quantitativen Angaben des Wasserstoffverbrauchs, sondern auch bei denen A. Papendiecks[66]), der angibt, Proto-porphyrin zu Meso-porphyrin hydriert zu haben, wobei er sich auf die spektroskopischen Befunde stützt. Diese können aber sowohl nach den Erfahrungen von H. Fischer[67]) als auch nach denen von mir nicht als genügend eindeutig angesehen werden; es ist daher notwendig, daß auch die Hydrierung des Proto-porphyrins unter quantitativer Verfolgung der Wasserstoffaufnahme wiederholt wird. Auch die Untersuchung des durch Enteisenung aus dem Dihydrohämin erhältlichen Porphyrins wird zur weiteren Klärung der Verhältnisse notwendig sein.

Aber auch schon aus den bisherigen Befunden lassen sich manche Schlüsse ziehen; um aber die Bedeutung des Dihydrohämins für die drei, hauptsächlich noch in Schwebe befindlichen Fragen der Häminkonstitution aufzeigen zu können, muß ich zuvor kurz den heutigen Stand des Konstitutionsproblems des Hämins darstellen.

B. Die verschiedenen Konstitutionsformeln des Hämins.

Durch die hervorragenden Arbeiten einer großen Zahl von Forschern, vor allem seien W. Küster, M. Nencki, J. Zaleski,

[66]) H. **152**, 215 (1926).
[67]) H. Fischer u. B. Walach, A. **450**, 171 (1926).

O. Piloty, R. Willstätter und H. Fischer genannt, sind die Grundzüge der Häminformel festgelegt worden. Elementaranalyse[68]) und Molekulargewichtsbestimmung[69]) führen zu der Formel $C_{34}H_{30}O_4N_4FeCl$[70]). Die quantitative Durchführung des oxydativen und reduktiven Abbaues[71]) haben mit Sicherheit ergeben, daß im Hämin vier Pyrrolringe enthalten sind. Sämtliche acht β-Stellungen dieser vier Pyrrolringe sind substituiert, und zwar sind bei zwei Pyrrolringen die zwei β-Stellungen durch je eine Methylgruppe und je einen Propionsäurerest, bei den beiden anderen Pyrrolringen durch je eine Methylgruppe und einen ungesättigten Rest substituiert. Das Eisen liegt in komplex gebundener Form vor; das Chlor, der einzigste Teil des Moleküls, der als solcher nicht im genuinen Blutfarbstoff enthalten, sondern erst bei der Hämindarstellung ins Molekül eingetreten ist, ist wahrscheinlich an das Eisen gebunden. Der Zusammenhalt der vier Pyrrolringe wird durch vier C-Atome bewirkt, die wahrscheinlich in allen acht α-Stellungen eingreifen, denn das Hämin gibt keine der Pyrrolreaktionen, die durch unsubstituierte Wasserstoffatome am Pyrrolskelett bedingt sind. (Ehrlichsche Reaktion mit Para-dimethyl-amido-benzaldehyd und Bildung von Azofarbstoffen mit Diazonium-chlorid.) Die vier wichtigsten Formelbilder, die für das Hämin aufgestellt worden sind, sind die von W Küster[72]), O. Piloty[73]), R. Willstätter[74]) und H. Fischer[75]) gegebenen. Am wenigsten vermag die Pilotysche Formel

---

[68]) Eine sehr reichhaltige Zusammenstellung von Ergebnissen der Elementaranalyse findet sich bei W. Küster (H. **40**, 391, 1903/04).

[69]) H. Fischer u. A. Hahn, B. **46**, 2308 (1913); es wäre aber notwendig, daß zur Bestätigung dieser Messung einmal eine Molekulargewichtsbestimmung unter milderen Bedingungen, als es siedendes Pyridin ist, gemacht wird.

[70]) R. Willstätters Formel (H. **87**, 423, 1913) mit nur 33 C dürfte durch die schönen Synthesen H. Fischers wohl endgültig widerlegt sein. Die H-Zahl ist noch nicht restlos sicher; Küsters Formel mit nur zwei Doppelbindungen in den Seitenketten führt zu H_{32}, Küsters Formel mit der Butadienbrücke zu H_{30}, H. Fischers Formel mit zwei Vinylen zu H_{30}, dieselbe Formel mit einem Vinyl- und einem Azetylenrest zu H_{28}. Die Elementaranalyse allein vermag bei dem großen Molekül zwischen H_{30} und H_{32} nicht zu entscheiden (H_{28} ist mit den Analysenresultaten schlecht vereinbar); als vorläufig wahrscheinlichsten Wert habe ich oben H_{30} eingesetzt.

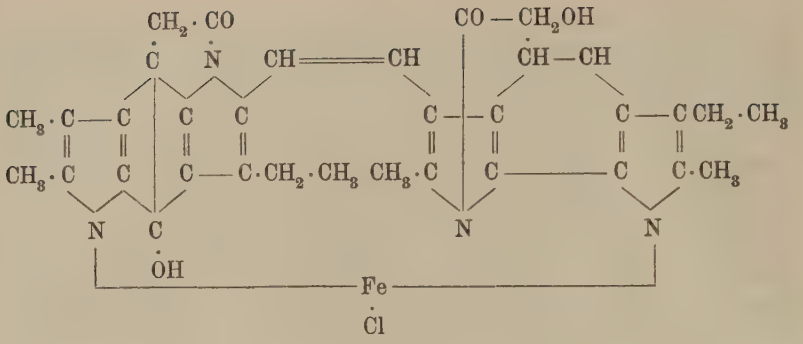
[71]) Siehe zusammenfassende Darstellung bei H. Fischer, Ergebn. d. Phys. **15**, 165 (1916).

[72]) H. **82**, 463 (1912).

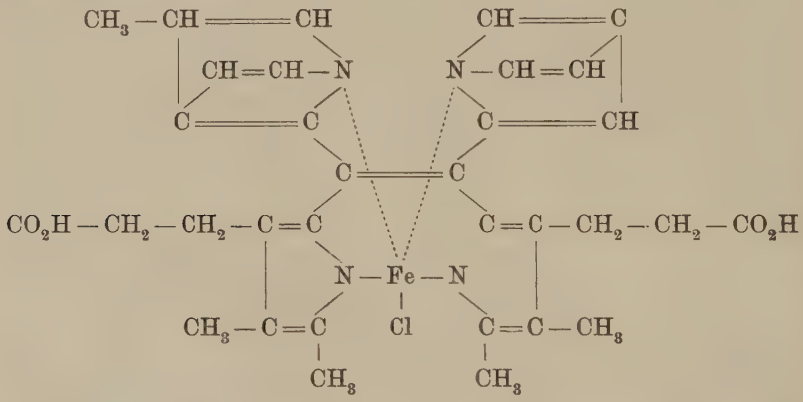
[73]) A. **377**, 368 (1910).

[74]) H. **87**, 423 (1913).

[75]) H. **89**, 255 (1914).



widerspruchslos die experimentellen Tatsachen zu erklären[76]), und sie ist heute wohl allgemein als unzureichend erkannt worden. Die Willstättersche Formel

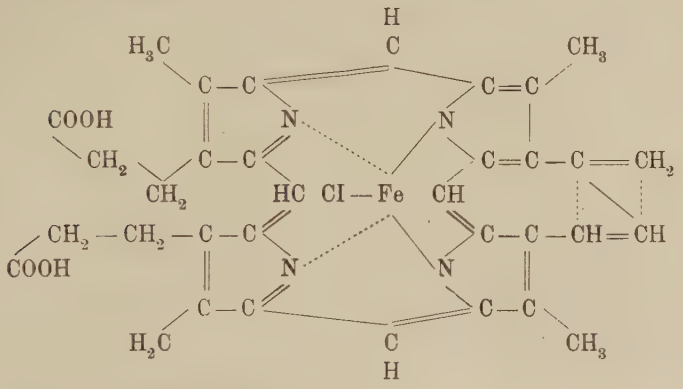


die zur Zeit ihrer Aufstellung wohl als das zutreffendste Bild vom Hämin anzusehen war, ist inzwischen durch verschiedene neue Tatsachen widerlegt worden. H. Fischer und K. Eismayer[77]) haben tetrapyrrylsubstituierte Äthane synthetisiert und zu den entsprechenden Äthylenen oxydiert; diese zeigen aber keinerlei Ähnlichkeiten mit den Porphyrinen. Die von R. Willstätter in zwei Pyrrolringen angenommenen Vinylbrücken sollten ein Ausdruck für die Tatsache sein, daß es nicht gelungen war, aus dem Hämin das Eisen zu entfernen,

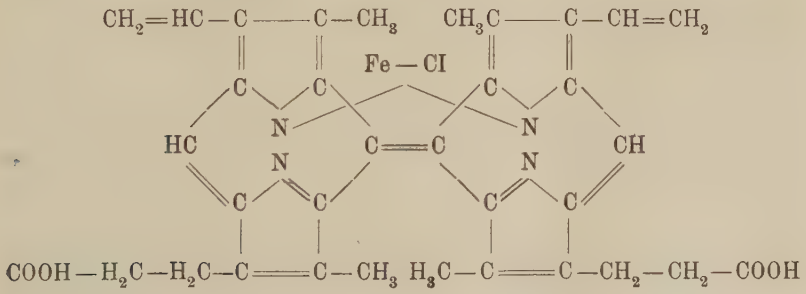
[76]) Siehe auch die Einwände R. Willstätters, H. **87**, 423 (1913), gegen die Pilotysche Formulierung.

[77]) B. **47**, 2026 (1914).

ohne gleichzeitig an die Seitenketten zwei Mol Wasser bzw. Wasserstoff anzulagern (Hämato-porphyrin- bzw. Meso-porphyrinbildung). Inzwischen ist aber sowohl von A. Papendieck[78]) als auch von H. Fischer[79]) das Protoporphyrin, d. i. das unveränderte dem Hämin zugrunde liegende Porphyrin, aus dem Hämin dargestellt worden. Am unzweideutigsten ist aber die Widerlegung der Willstätterschen Formel durch die schönen H. Fischerschen Porphyrinsynthesen[80]) erfolgt, die beweisen, daß zur Bildung eines Porphyrins es unbedingt notwendig ist, daß alle acht α-Stellen der vier Pyrrole an der gegenseitigen Verknüpfung teilnehmen. Ich glaube, daß heute nur noch die Formel von W. Küster:



oder die H. Fischersche Formel

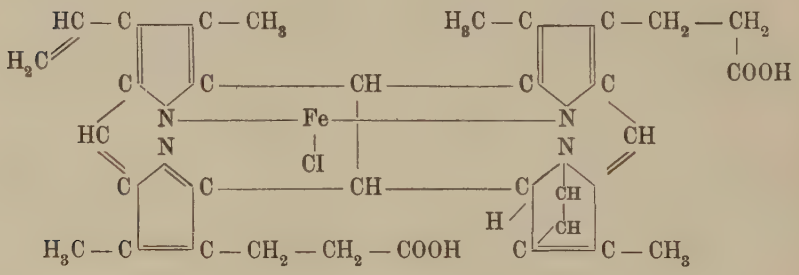


[78]) A. Papendieck u. K. Bonath, H. **144**, 60 (1925). Die Uneinheitlichkeit der Nomenklatur in der Blutfarbstoff-Chemie ist noch ein arger Mißstand.

[79]) H. Fischer u. B. Pützer, H. **154**, 39 (1926).

[80]) Vor allem die aus αα′ unsubstituierten Pyrrolen und Ameisensäure, H. Fischer u. A. Treibs, A. **450**, 132 (1926).

als für das Hämin in Betracht kommend gelten können. Beide Formeln vermögen gut sämtliche Spaltstücke, die bisher beim oxydativen und reduktiven Abbau aufgefunden worden sind, zu erklären, und es ist vorläufig noch nicht möglich, endgültig zu entscheiden, welche von den beiden Formeln die richtige ist. Die Hauptverschiedenheit beider Formeln ist die unterschiedliche Struktur des Porphyrinskeletts. Bei W. Küster wird durch die vier Methingruppen, die acht α-ständigen C-Atome der vier Pyrrole und die vier N-Atome ein sechszehngliedriger Ring gebildet. Von den vier Pyrrolringen liegt einer als echtes Pyrrol, zwei als Pyrrolene und einer als Pyrrolin[81]) vor. Nach H. Fischer sind zwei achtgliedrige Ringsysteme durch eine Doppelbindung zusammengehalten (Anklang an R. Willstätters Formel); von den vier Pyrrolringen liegen zwei als echte Pyrrole, und zwei als Pyrolene vor. Eine Mittelstellung nimmt die Formulierung mit zwei neungliedrigen Ringen ein,



wie sie sowohl von H. Fischer[82]) als auch von W. Küster[83]) gelegentlich in Betracht gezogen worden ist. Neuerdings ist von H. Fischer für die Porphyrine eine di-indigoide Formel[84]) vorgeschlagen worden:

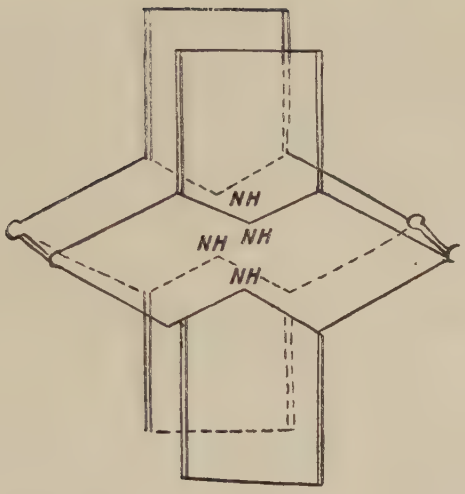
---

[81]) Schon R. Willstätter (H. **87**, 428, 1913) hat darauf hingewiesen, daß die Tatsache, daß die Küstersche Formel sich nur durchführen läßt, wenn ein Pyrrolinring angenommen wird, eine Schwäche dieser Formel ist.

[82]) H. **152**, 300 (1926).

[83]) Abderhaldens Handbuch der biolog. Arbeitsmethoden I, 8, 319.

[84]) H. Fischer u. P. Halbig, A. **448**, 195 (1926). Der besseren Übersicht halber ist nur das Porphyrinskelett wiedergegeben.



Sie hat den Vorteil der räumlichen Anschaulichkeit für sich, ist aber nicht mit der Tatsache vereinbar, daß das Ätio-porphyrin nur zwei[85]) und nicht vier aktive Wasserstoffe hat. In der Folge beschränke ich mich auf die Diskussion der Formel mit sechszehngliedrigem Ring von W. Küster und der zwei achtgliedrige Ringe enthaltenden von H. Fischer, da von den beiden Autoren diesen Formeln am meisten Gewicht beigelegt wird.

Über die Formulierung der ungesättigten Seitenketten sind sich übrigens die beiden Autoren ebenfalls nicht einig. W. Küster nimmt eine zwei Pyrrolringe verbindende Butadienbrücke an, H. Fischer eine Vinyl- und eine Azetylengruppe.

Die Frage nach der Art der Komplexbildung zwischen der Chlorferrigruppe und dem Porphyrinskelett wird von beiden Autoren gleichartig beantwortet, und zwar wird von beiden angenommen, daß das Eisen mit zwei Hauptvalenzen an zwei Stickstoffatome zweier Pyrrolringe gebunden ist und außerdem durch Nebenvalenzen mit den beiden anderen Stickstoffatomen in Verbindung steht. Ich glaube aber, wie später noch zu erörtern sein wird, daß auch dieser Fragenkomplex noch nicht restlos geklärt ist.

Leider ist die Hauptfrage der Blutfarbstoffchemie, die nach der Struktur des Porphyrinskeletts trotz der schönen synthetischen Erfolge H. Fischers, immer noch nicht geklärt. Sowohl die Synthese durch

[85]) H. Fischer u. J. J. Postowski, H. **152**, 300 (1926).

Einwirkung von konzentrierter Schwefelsäure auf gebromte Dipyrrylmethene[86]), als auch die durch Brenzreaktion von $\alpha\alpha'$ Dicarbonsäuren von Dippyrryl-methanen[87]), haben sicherlich keinen ganz einfachen Reaktionsverlauf, und so können sie keinen Aufschluß geben über die Struktur der entstehenden Porphyrine. Die Synthese durch Einwirkung von Ameisensäure auf $\alpha\alpha'$ unsubstituierte Pyrrole[88]) (z. B. Opsopyrrol und Opso-pyrrol-carbonsäure) läßt sich recht gut sowohl nach der W. Küsterschen als auch nach der H. Fischerschen Formulierung erklären.

C. Die Argumente für die Küstersche und die Fischersche Formulierung.

Es seien hier kurz die Argumente zusammengestellt, die einerseits für die Küstersche Formel, andererseits für die Fischersche Formel sprechen. Für die Küstersche Formulierung spricht vor allem die Existenz eines Tetra-chlor-meso-porphyrins, das ein Substitutionsprodukt, kein Additionsprodukt des Mesoporphyrins ist, wie aus seiner Reduzierbarkeit zu Mesoporphyrin zu ersehen ist. Daß die Substitution im Kern und nicht in den Seitenketten erfolgt ist, ist wegen der völlig anderen physikalischen Eigenschaften des Tetra-chlorkörpers und wegen der leichten Eliminierbarkeit des Chlors wahrscheinlich. Nach der Küsterschen Formulierung enthält das Porphyrinskelett vier tertiäre Wasserstoffe (in den Methingruppen), die im Tetra-chlorkörper durch Chlor ersetzt sein können. Die Fischersche Formulierung gibt nicht die Möglichkeit zur Formulierung des Tetra-chlorkörpers mit vier gleichartig[89]) das Porphyrinskelett substituierenden Chloratomen. Für die Küstersche Formulierung spricht auch das Nichtauffinden von α-äthylsubstituierten Spaltstücken des reduktiven Abbaus des Hämins[90]), ebenso wie das Nichtauffinden von Spaltstücken des Hämmoleküls, die noch zwei Pyrrolkerne enthalten, während im Gegensatz

---

[86]) H. Fischer u. J. Klarer, A. **448**, 178 (1926).
[87]) H. Fischer u. P. Halbig, A. **448**, 193 (1926).
[88]) H. Fischer u. A. Treibs, A. **448**, 132 (1926).
[89]) Die Gleichartigkeit der vier Chloratome im Tetrachlorkörper ist keine vollkommene; ein Chloratom ist leichter abspaltbar als die anderen; die Küstersche Formel weist aber auch einem Chloratom, und zwar dem, das an dem Kohlenstoffatom sitzt, das sowohl dem sechszehngliedrigen Ring als auch dem durch die Butadienbrücke gebildeten achtgliedrigen Ring angehört, eine Sonderstellung zu.
[90]) Die als solches von O. Piloty angesprochene Xanto-pyrrol-carbonsäure hat von H. Fischer trotz eifrigsten Bemühens nicht wieder aufgefunden werden können (Ergebn. d. Phys. **15**, 208, 1916).

dazu Indigo durch Oxydationsmittel sehr leicht unter Sprengung der Äthylenbrücke zu Isatin oxydiert wird.

H. Fischer führt für seine Formulierung die formale Ähnlichkeit seiner Porphyrinformel mit dem Indigo an; ferner das Vorhandensein zahlreicher Isomere, die sich nach seiner Formel leichter erklären ließen wie nach der W. Küsterschen, und vor allem in einer neueren Arbeit[91]) die Existenz eines nur ein Sauerstoffatom enthaltenden Oxydationsproduktes des Ätioporphyrins. Zu den Fischerschen Argumenten erlaube ich mir folgendes zu bemerken:

Die formale Ähnlichkeit mit dem Indigo fällt wohl nur wenig ins Gewicht, es scheint vielmehr, daß in der Pyrrolchemie die Bildung eines sechzehngliedrigen Ringes[92]) besonders bevorzugt ist, wie aus den Arbeiten von W. W. Tschelinzew und B. W. Tornow[93]) hervorgeht, die beim Azetonpyrrol von A. von Baeyer[94]) den sechzehngliedrigen Ring äußerst wahrscheinlich gemacht haben[95]).

Die Isomerieverhältnisse bei den Porphyrinen sind so kompliziert, daß sie sich heute kaum völlig überblicken lassen; so sind beim Heptamethyl-mono-äthyl-porphin nach Küsters Formulierung acht, nach Fischers vier Isomere möglich. Für andere Kombinationen von Substituenten werden die Verhältnisse noch komplizierter.

Wenn das neuartige Oxydationsprodukt der Porphyrine[96]) wirklich, wie H. Fischer meint, ein Äthylenoxyd ist, so wäre damit wohl die Richtigkeit der indigoiden Formel erwiesen. Doch scheint es mir vorläufig noch nicht sicher, daß es sich bei dem fraglichen Körper wirklich um ein Äthylenoxyd handelt. H. Fischer nimmt ganz mit Recht an, daß bei einem Körper mit gesättigten Seitenketten, wie dem Ätioporphyrin die Oxydation kaum in den Seitenketten angegriffen haben wird, sondern wahrscheinlichst im Porphinkern. Bei der Küsterschen Formulierung mit vier Methingruppen sei es unerklärlich, wieso nur ein Sauerstoff und nicht vier in das Molekül eingetreten seien, während

---

[91]) H. Fischer, P. Halbig u. B. Walach, A. **452**, 268 (1927).

[92]) Im Gegensatz zu R. Willstätters Einwänden gegen einen so vielgliedrigen Ring (H. **87**, 428, 1913).

[93]) Journ. der russ. Physik.-chem. Gesellschaft **48**, 105, 127, 196 (1921); Zentralblatt 1922 Bd. III, 1295.

[94]) B. **19**, 2184 (1886).

[95]) Als Zwischenprodukt läßt sich bei geringfügiger Abänderung der Reaktionsbedingungen ein Kondensationsprodukt, das vier Pyrrole und drei Acetone enthält, gewinnen; dieses kondensiert sich mit einem weiteren Molekül Aceton zu einem Acetonpyrrol Baeyers; die direkte Molekulargewichtsbestimmung desselben ergibt ein dreifaches Molekulargewicht des sechszehngliedrigen Ringes. Wahrscheinlich infolge Assoziation.

[96]) A. **452**, 274 (1927).

die zentrale Doppelbindung der Fischerschen Formulierung die Bildung eines Äthylenoxyds und damit die Aufnahme nur von einem Sauerstoffatom sehr wohl möglich erscheinen lasse. Ein Einwand hiergegen ist, daß die Bildung von Äthylenoxyden hauptsächlich nur bei rein aliphatischen bzw. hydroaromatischen Doppelbindungen beobachtet worden ist, während Doppelbindungen, die cyklische Substituenten tragen, weit weniger zur Bildung von Äthylenoxyden befähigt sind. So ist erst ganz neuerdings von M. Tiffenau und J. Lévy[97]) nach der Methode von Prileschaeff[98]) das Äthylenoxyd des Stilbens dargestellt worden, während ein Äthylenoxyd des Indigos noch unbekannt ist. (In diesem Fall könnte die Nachbarschaft der Carbonylgruppen die Bildung des Äthylenoxyds nach der Methode von Prileschaeff besonders erschweren; vgl. die Verhältnisse bei den α-β ungesättigten Ketonen[99]). Andererseits ist es durchaus möglich, daß der sechzehngliedrige Ring noch einigermaßen stabil ist, solange nur eine $\gg$CH-Gruppe[100]) in eine $\gg$COH-Gruppe umgewandelt ist, während nach der Oxydation von mehr als einer Methingruppe das Molekül in kleinere Bruchstücke zerfällt; die Tatsache der sehr schlechten Ausbeute an dem Oxydationsprodukt steht mit dieser Annahme in Einklang. Eine Möglichkeit, die auch nicht ganz von der Hand zu weisen ist, ist die Bildung eines Aminoxydes durch die Einwirkung von H_2O_2 in schwefelsaurer Lösung. Jedenfalls bedarf es noch einer genaueren Untersuchung des Oxydationsproduktes von H. Fischer, bevor sich etwas Endgültiges über die Bindungsart des Sauerstoffs in ihm sagen läßt.

D. Die Stützung der Küsterschen Formel durch das Dihydrohämin.

So scheint mir die Gesamtheit der bisher bekannten Tatsachen der Blutfarbstoffchemie sich leichter mit der Küsterschen Formulierung in Einklang bringen zu lassen als mit der Fischerschen[100a]). Auch die Eigenschaften des Dihydrohämins lassen sich leichter mit Hilfe der

[97]) Bull. de Soc. Chim. de France (4) **39**, 763 (1926).

[98]) B. **42**, 4811 (1909) und B. **43**, 959 (1910).

[99]) E. Weitz u. A. Scheffer, B. **54**, 2237 (1921); es werden in diesen Fällen aber durch alkalische Hydroperoxyd Äthylenoxyde gebildet.

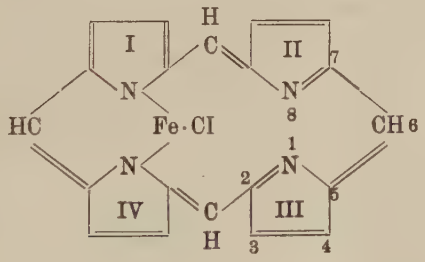
[100]) Die Tatsache, daß auch nach W. Küsters Formulierung die Gleichartigkeit der vier Methine keine vollkommene ist (siehe Fußnote 89), würde es besonders verständlich erscheinen lassen, daß primär nur ein Sauerstoffatom ins Molekül eintritt.

[100a]) H. Fischer hat neuerdings seine Formel zugunsten der Küsterschen Formel zurückgezogen, siehe A. **457**, 211, 1927 u. B. **61**, 1271, 1928, so daß heute nur noch die Küstersche Formel als zutreffendes Bild für das Hämin anzusehen ist.

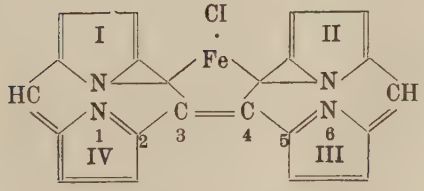
Küsterschen Formulierung als mit der H. Fischerschen deuten. Bei der Formulierung des Dihydrohämins ist vor allem zu berücksichtigen, daß die beiden Wasserstoffatome so addiert sein müssen, daß sie bei der Zerewitinoff-Bestimmung als aktive Wasserstoffe erscheinen. Das schließt aus, daß die Addition an den ungesättigten Seitenketten erfolgt ist; bei dem Übergang einer Äthylenbindung in eine Äthanbindung bzw. bei der partiellen Hydrierung eines Butadiens können wohl kaum neue aktive Wasserstoffe entstehen. Bei der Halbhydrierung eines Acetylens, wenigstens eines endständigen, müßte ja sogar ein aktives Wasserstoffatom verschwinden, denn Phenylacetylen gibt z. B. bei der Zerewitinoff-Bestimmung ein aktives Wasserstoffatom. Die zwei Wasserstoffe, die bei der katalytischen Hydrierung des Hämins aufgenommen worden sind, sind also mit größter Wahrscheinlichkeit am Porphinskelett addiert worden, und das Dihydrohämin ist wohl kaum eine Zwischenstufe zwischen Hämin und Mesohämin, denn es wäre schwer vorstellbar, wie bei der Aufnahme weiterer Wasserstoffe die Zahl der aktiven Wasserstoffe wieder zurückginge.

Wenn man sich das Hämin unter Weglassung der Seitenketten nach Küster durch Formel A bzw. nach Fischer durch Formel B wiedergegeben denkt:

(A)

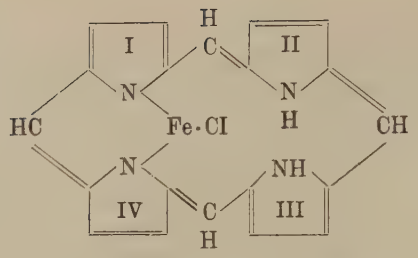


(B)

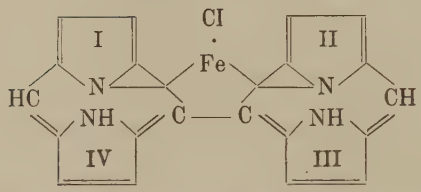


so würde mit größter Wahrscheinlichkeit des Dihydrohämin durch Formel C bzw. durch Formel D wiederzugeben sein:

(C)

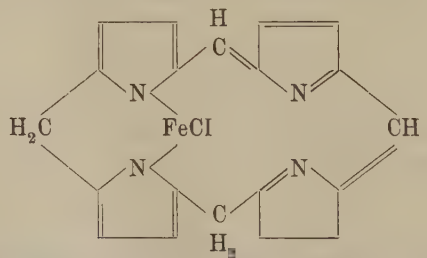


(D)



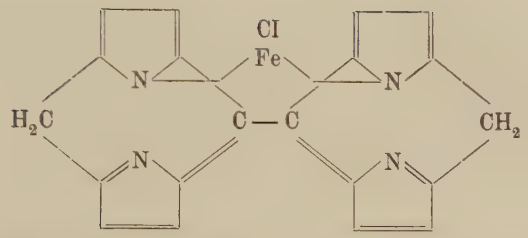
In beiden Fällen wäre die Addition an den Enden einer längeren Kette von konjugierten Doppelbindungen erfolgt. R. Kuhn und A. Winterstein[101]) haben neuerdings bewiesen, daß die J. Thielesche Theorie, daß die Addition von Wasserstoff an konjugierten Systemen von Doppelbindungen vorzugsweise endständig erfolge, nicht nur für Butadiene, sondern auch für längere Systeme gilt. Nach der Küsterschen Formulierung würde es sich bei der Dihydrohäminbildung um eine 1.8-Addition, nach der Fischerschen Formulierung um eine 1.6-Addition handeln (es sind bei den Formelbildern die entsprechenden Numerierungen eingefügt). Außer den gewählten Formelbildern, wo beide neu hinzukommenden Wasserstoffatome am Stickstoff sitzen, wären zwar noch andere denkbar, doch erscheinen mir die Formelbilder C und D am einleuchtendsten. Man könnte entsprechend der Küsterschen Formulierung das Dihydrohämin auch gemäß E bzw. entsprechend der Fischerschen Formulierung gemäß F formulieren:

(E)



[101]) Vorgetragen am 22. April 1927 in München bei der Tagung Südwestdeutscher Chemiker, inzwischen erschienen in Helvetica chimica acta; **11**, 123, 1928.

(F)



In beiden Fällen müßte man annehmen, daß von jeder Methylengruppe zwischen zwei Pyrrolen ein Wasserstoff nach Zerewitinoff reagiere, wie es ähnlich von V. Grignard und Ch. Courtot[102]) für das Fluoren festgestellt worden ist. Hiergegen spricht aber der Befund von H. Fischer und J. J. Postowsky[103]), daß Dipyrrylmethane nur zwei aktive Wasserstoffe haben. Derselbe Einwand würde auch für Formeln gelten, in denen eine Addition an einem konjugierten System Pyrrolenstickstoff - Methingruppe stattgefunden hätte[104]); Formeln, wo eine Addition am Pyrrolenstickstoff und am benachbarten C-Atom stattgefunden hätte, kommen ganz und gar nicht in Betracht, denn in ihnen wäre sicher nur eins der neuaddierten Wasserstoffatome aktiv (am Pyrrolkern sitzende Wasserstoffatome reagieren nicht nach Zerewitinoff!). Ein weiterer Einwand gegen derartige Formulierungsmöglichkeiten ist die Tatsache der weitgehenden physikalischen und chemischen Ähnlichkeiten des Hämins und des Dihydrohämins. All diese Formulierungen des Dihydrohämins würden aber in der Art der Konjugation der Doppelbindungen stark verschieden sein vom Hämin (sie würden eine viel unvollkommenere Konjugation haben). Nur in der Formulierung C ist Art und Zahl der Konjugationen gleichartig wie in der dazugehörigen Häminformel A. Wenn die Häminformel B die von H. Fischer hervorgehobene Ähnlichkeit mit dem Indigo hat, so ähnelt die dazugehörige Dihydrohäminformel D dem Indigweiß; man müßte also erwarten, daß sich Hämin und Dihydrohämin in ihrem Absorptionsspektrum stark voneinander unterscheiden; das ist aber nicht der Fall, sondern beide haben das gleiche Absorptionsspektrum.

Wenn also auch andere Möglichkeiten nicht völlig auszuschließen sind, so ist es doch recht wahrscheinlich, daß dem Dihydrohämin die Formel C zukommt; dann ist aber auch für das Hämin die Formel A (Küster) wahrscheinlicher als die Formel B (Fischer).

---

[102]) C. r. **152**, 1493 (1911).
[103]) H. **152**, 300 (1926).
[104]) In diesen Fällen wäre außer dem Dihydro-hämin auch ein Tetrahydrohämin zu erwarten, das aber nicht zu existieren scheint.

E. Das Problem der ungesättigten Seitenketten.

Über den zweiten noch nicht völlig geklärten Punkt der Häminstruktur, die Natur der ungesättigten Seitenketten, lassen sich auf Grund der Auffindung des Dihydrohämins weitaus nicht so positive Aussagen machen wie über die Struktur des Porphinkerns. Immerhin ist aber die Resistenz der ungesättigten Seitenketten gegen eine katalytische Hydrierung ein Hinweis dafür, daß im Hämin kaum eine Acetylengruppe enthalten ist, die ja, wie die Versuche von E. Ott und R. Schröter[105]) zeigen, ganz besonders leicht der katalytischen Hydrierung bzw. Halbhydrierung anheim fällt. Hierfür spricht unter anderm auch, daß es nicht möglich ist, mit ammoniakalischer Silberlösung aus in Ammoniak gelöstem Hämin ein Silbersalz zu fällen (typische Reaktion aller endständigen Acetylengruppen). Ich glaube, daß die Annahme W. Küsters[106]), daß die beiden ungesättigten Seitenketten untereinander zu einem Butadien verbunden sind, sehr viel für sich hat. Küster führt für sie ins Feld, daß es ihm gelungen ist, an Häminester ein Molekül Brom anzulagern und dann weiter aus diesem Produkt ein Dibrom-dimethyläther-dimethylester des Hämatoporphyrins zu erhalten, der bei der Oxydation zwei Mol eines Methyl-äthyl-malein-imids liefert, dessen Äthylgruppe α ständig durch ein Brom, und β ständig durch eine Methoxylgruppe substituiert ist. Das Vorhandensein des Butadiensystems würde es auch verständlich machen, daß die ungesättigten Seitenketten katalytisch nicht reduzierbar sind. Die Tatsache, daß bei durchgreifender Reduktion (mit Jodwasserstoff-Jodphosphonium in Eisessig) eine C-C-Bindung gelöst wird, hat ja schon Analoga[107]). Die Einwände sterochemischer Art, die H. Fischer[108]) gegen diese Formulierung erhoben hat, sind, solange der Reaktionsverlauf der Ätio-porphyrin-synthesen nicht restlos geklärt ist, nicht in der Lage, die für diese Formulierung sprechenden Argumente zu entkräften.

F. Die Bindungsart des Eisens.

Für die Bindungsart des Eisens im Hämin scheint mir die Bestimmung der aktiven Wasserstoffe nach Zerewitinoff recht bedeutungsvoll. Zwei der aktiven Wasserstoffe entfallen zweifelsohne auf

---

[105]) B. **60**, 624 (1927).
[106]) W. Küster u. W. Heeß, B. **58**, 1022 (1925).
[107]) Siehe H. Wieland, B. **58**, 102 (1925).
[108]) H. Fischer u. F. Lindner, H. **161**, 1 (1926).

die beiden Carboxyle des Hämins. Das dritte aktive Wasserstoff des Hämins ist aus der Formel heraus nicht ohne weiteres zu erklären, und H. Fischer und J. J. Postowsky[109]) haben angenommen, daß das dritte Mol Gas nicht Methan, sondern Methylchlorid, gebildet durch das Chlor des Hämins, sei. Sie führen an, daß nach B. Oddo[110]) Eisen-(3-)chlorid unter Entwicklung von Methylchlorid mit Methyl-magnesium-jodid reagiert, und auch Tri-phenyl-chlormethan soll nach ihren eigenen Beobachtungen nach Zerewitinoff ein halbes Mol Gas liefern. Die Überprüfung der Oddoschen Angabe ergab deren Richtigkeit, während Tri-phenyl-chlormethan mit Methyl-magnesium-jodid bei Verwendung von ganz reinem und ganz trockenem Tri-phenyl-chlormethan auch keine Spur von Gasentwicklung gibt. Schon E. Späth[111]) hatte festgestellt, daß bei dieser Reaktion zu 95% der Theorie Methyl-triphenyl-methan entsteht. Ein Versuch in dem von Hämin mit Methyl-magnesium-jodid entwickelten Gas etwa vorhandenes Methylchlorid durch Schütteln des Gases mit alkoholischer Kalilauge[112]) nachzuweisen, verlief negativ[113]). Das dritte Mol Gas, das Hämin bei der Zerewitinoff-Bestimmung gibt, ist also kein Methylchlorid; vorläufig läßt sich aber noch keine zwingende Erklärung für dies dritte aktive Wasserstoffatom geben, und es muß dahingestellt bleiben, ob das Hämin wirklich noch ein drittes aktives Wasserstoffatom besitzt, oder ob eine andersartige Reaktion das dritte Volumen Gas liefert[114]).

---

[109]) H. **152**, 300 (1926).

[110]) Gaz. chim. Ital. **44**, II, 268 (1914).

[111]) M. **34**, 1915 (1913).

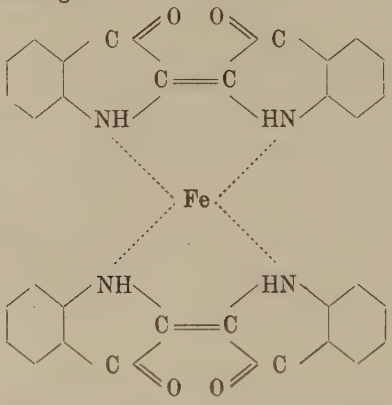
[112]) Nach P. Petrenko-Kritschenko (Journ. f. prakt. Chemie **111**, 23, 1925; Zeitschr. f. physik. Chemie **116**, 113, 1925) verläuft zwar die Umsetzung zwischen Methylchlorid und alkoholischer Lauge nicht quantitativ, aber immerhin so, daß sie sich gut zum qualitativen Nachweis von Methylchlorid eignet. Alkoholische Lauge, die mit dem aus Eisen-(3-)chlorid und Methyl-magnesium-jodid entwickelten Gas geschüttelt worden war, gab dementsprechend nach dem Ansäuern mit Salpetersäure auch einen kräftigen Chlorsilberniederschlag.

[113]) Gegen die Annahme, daß das Chlor des Hämins in Form von Methylchlorid das dritte Mol Gas liefert, spricht auch die Tatsache, daß Jodhämin ebenfalls genau drei Mol Gas entwickelt. Methyljodid mit einem Siedepunkt von 45° müßte sich in dem mit 9—11° warmen Wasser gekühlten Eudiometer kondensieren und könnte also nicht die Volum-messung beeinflussen.

[114]) Nach Abschluß der experimentellen Arbeiten sind mir noch verschiedene Erklärungsmöglichkeiten für die Tatsache, daß Hämin nach Zerewitinoff mehr als zwei Mol Gas gibt, eingefallen. Man kann annehmen, daß das Chlor des Hämins mit dem Methyl-magnesium-jodid unter gleichzeitiger Reduktion des Hämins zum Hämochromogen und Bildung von MgClJ reagiert; es würde dann intermediär das Radikal CH_3 gebildet; dieses könnte sich dann entweder wie bei der Kolbeschen Synthese zu Äthan polymerisieren oder nach dem H. H. Schlubachschen Schema (vgl. z. B. die Dissertation von

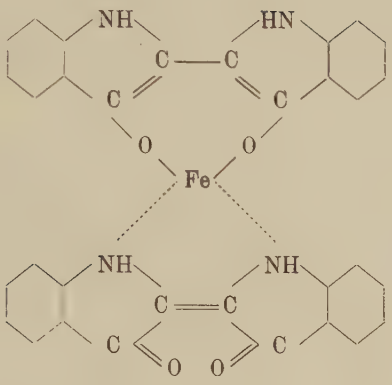
G. Die Theorie von Kunz und Kresz.

Die merkwürdige Tatsache, daß Mesohämin und Mesoporphyrin[115]) dieselbe Zahl aktiver Wasserstoffe besitzt, scheint eine Stütze für die von K. Kunz und A. J. Kresz[116]) aufgestellte Hypothese zu sein, daß im Blutfarbstoff, ähnlich wie in ihrer Eisen-indigo-verbindung, das Eisen nur durch Nebenvalenzen an den organischen Rest gebunden ist. Nun genügen aber wohl kaum die experimentellen Befunde von Kunz und Kresz, um jede andere Formulierung der von ihnen entdeckten Eisen-indigo-verbindung auszuschließen; z. B. wäre außer der von ihnen gegebenen Formulierung:



M. Gruber, München 1927) zu Methan und Äthylen disproportionieren. Im ersten Fall würden $2CH_3$ ein C_2H_6, im zweiten Fall $4CH_3$ zwei CH_4 und ein C_2H_4 liefern; nach der ersten Formulierung würde dann das Hämin 2,5 Mol Gas, nach der zweiten 2,75 Mol Gas bei der Zerewitinoff-Bestimmung geben können. Gegen diese Annahme spricht zwar die Tatsache, daß die Zerewitinoff-Bestimmung sehr genau 3 Mol Gas gibt; eine sichere Entscheidung ist aber nur herbeizuführen, wenn man eine exakte Gasanalyse durchführt. — Eine andere Möglichkeit, die auch in Betracht zu ziehen ist, besteht darin, daß das alkalisch reagierende Pyridin aus dem Hämin unter Dehydro-chlorid-häminbildung Salzsäure abspaltet (siehe W. Küster, H. **40**, 408, 1903/04); falls zu dieser HCl-Abspaltung ein anderes H-Atom als die der Carboxylgruppen verwendet würde, was zwar nicht übermäßig wahrscheinlich ist, so würde hierdurch das Mehr von einem aktiven H-Atom erklärt werden. Man müßte versuchen, die Zerewitinoff-Bestimmung unter Ausschluß basischer Lösungsmittel durchzuführen. Das einzige mir bekannte, nicht basische Lösungsmittel für Hämin, ist das von L. Anschütz u. W. Broeker, B. **59**, 2844 (1926) empfohlene Dioxan. Leider ist aber auch darin die Löslichkeit des Hämins recht gering. Inzwischen ist eine Arbeit von R. Kühn u. M. Furter, B. **61**, 127, 1928, erschienen, die sich eingehend mit dem dritten aktiven Wasserstoffatom des Hämins beschäftigt und zu dem Schluß kommt, daß das dritte Wasserstoffatom auf ein abgespaltenes HCl zurückzuführen ist.

auch diese Formulierung möglich:



bei der es sich um eine Molekülverbindung zwischen einem Molekül Indigo und einem Molekül eines Derivates des Indigweiß, bei dem die Wasserstoffatome der OH-Gruppe durch Fe ersetzt sind, handeln würde; hierfür ließe sich anführen, daß nach M. Müller-Kunradi, M. Luther und K. Pieroh[117]) Eisencarbonyl ein vorzügliches Reduktionsmittel ist. Auch die Gleichheit der Zahl der aktiven Wasserstoffatome im Mesohämin und Mesoporphyrin genügt noch nicht, um die Richtigkeit der Kunz und Kreszschen Hypothese für die Blutfarbstoffderivate zu beweisen. Man müßte hierzu ein weit größeres Versuchsmaterial haben, vor allem müßte man auch die carboxylfreien Porphyrine, bei denen Unsicherheiten durch etwaige Betainbildung ausgeschlossen sind, z. B. das Ätioporphyrin mit heranziehen und vielleicht auch noch andere Metallkomplexverbindungen als die Chlorferriverbindungen, z. B. die komplexen Kupfersalze, die kein Halogen enthalten.

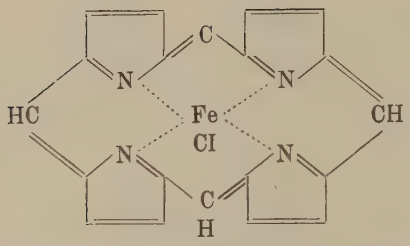
Wenn man das Hämin unter Weglassung der Seitenketten gemäß dem Vorschlag von Kunz und Kresz formuliert, so kommt man zu folgendem Formelbild:

---

[115]) Vom Mesoporphyrin selbst liegt keine Zerewitinoff-Bestimmung vor. H. Fischer u. J. J. Postowsky haben Meso-porphyrin-dimethyl-ester untersucht, der ein aktives Wasserstoff hat; in Übereinstimmung hiermit hat das Dichlorhydrat des Mesoporphyrins fünf aktive Wasserstoffe und aus diesen beiden Bestimmungen ist wohl eindeutig zu entnehmen, daß dem Mesoporphyrin selbst drei Wasserstoffe zukommen.

[116]) B. **60**, 367 (1927).

[117]) D. R. P. 441, 179 Kl. 120; C. (1927), I, 2135.



das sich vor allem durch sehr große Symmetrie auszeichnet; alle vier Pyrrolkerne liegen bei ihm in Pyrrolenform vor. Die Bildung des Dihydrohämins wäre gut formulierbar, nur wäre auch ein Tetra-hydrohämin zu erwarten, das noch zwei aktive Wasserstoffe mehr enthielte. Die Tatsache, daß im nach Kunz und Kresz formulierten Hämin das Eisen nur eine Hauptvalenz betätigen würde, wäre nach den neueren Arbeiten von W. Manchot[118]), der die Existenz von null- und einwertigem Eisen bewiesen hat, kein Grund, die Formel als unmöglich anzusehen. Es ließen sich evtl. die weitaus größeren katalytischen Wirksamkeiten der Blutfarbstoffderivate als die aller anderen Eisenverbindungen so deuten, daß es sich dabei um eine Eigenschaft des einwertigen Eisens[119]), das in den Blutfarbstoffderivaten durch Komplexbildung stabilisiert sei, handele. Es muß aber erwähnt werden, daß die Tatsache, daß nach H. Fischer und J. J. Postowsky das Ätioporphyrin zwei aktive Wasserstoffe hat, im Widerspruch zu der Formulierung von Kunz und Kresz steht (danach müßte es kein aktives Wasserstoff haben). Meine persönliche Ansicht geht dahin, daß trotz einiger interessanter neuer Gesichtspunkte der Kunz und Kreszsche Gedanke nicht das richtige trifft[119a]), sondern wohl doch die R. Willstättersche Annahme[120]), daß Mg und > FeCl in den Blatt- bzw. Blutfarbstoffen „in Analogie mit den von H. Ley und L. Tschugaeff erforschten Metallderivaten der Säureimide" zwei Wasserstoff-

[118]) B. **59**, 2445 (1926).

[119]) Über das Problem der Wertigkeit des Eisens in den verschiedenen Blutfarbstoffderivaten gibt es eine umfangreiche Literatur; vgl. z. B. W. Küster, B. **43**, I, 370 (1910) und W. Manchot, H. **70**, 230 (1910/11); wenn heute auch wohl mit Recht zumeist angenommen wird, im Hämoglobin und Hämochromogen liegen Ferroverbindungen vor, im Methämoglobin und Hämatin bzw. Hämin Ferriverbindungen, während das Oxyhämoglobin als Moloxyd einer Ferroverbindung anzusehen ist, so ist es doch nicht völlig auszuschließen, daß man evtl. diese Anschauung einmal revidieren müßte.

[119a]) Nachtrag bei der Korrektur: Die Unrichtigkeit der Befunde von Kunz u. Kresz ist inzwischen durch eine Arbeit von R. Kühn und H. Machemer, B. **61**, 118, 1928, bewiesen worden.

[120]) R. Willstätter u. H. Fritzsche, A. **371**, 33 (1909) S. 49.

atome am Stickstoff ersetzen[121]). Eine Stütze würde diese Annahme durch den Nachweis erhalten, daß die Einführung von Mg in die Porphyrine mit Hilfe von CH_3MgJ unter Einwirkung von 2 Molen Methan erfolgt, wie das nach R. Willstätter der Fall sein müßte.

H. Die Vorgänge bei der Auflösung des Hämins.

Auch über die Vorgänge bei der Auflösung des Hämins in alkalischen Medien (und nur in alkalischen Medien ist das Hämin einigermaßen löslich) habe ich mir Gedanken gemacht. Es ist wohl ohne Zweifel, daß hierbei ein Austausch des Chlors gegen eine Hydroxylgruppe stattfindet. Es hat aber den Anschein, als ob die Geschwindigkeit dieser Reaktion, wenn man zum Auflösen ein sehr schwach basisches Lösungsmittel nimmt, z. B. sekundäres Natriumphosphat, eine recht geringe ist. Auf diesen Gedanken hat mich die Tatsache gebracht, daß die katalatische Wirksamkeit des Hämins (gemessen bei niedrigem pH) bei monatelangem Aufheben der Auflösung des Hämins in Na_2HPO_4 zunimmt. Wenn man nun mit Hilfe einer Kalomelelektrode (einer sogenannten Elektrode zweiter Art) die Chlor-ionenkonzentration in einer frisch bereiteten und in einer fünf Monate alten gleichkonzentrierten Auflösung von Hämin in Na_2HPO_4 bestimmt, so findet man in der gealterten Lösung eine wesentlich höhere Chlor-ionenkonzentration als in der frischen Lösung. Die einzigste Erklärung hierfür ist, daß das Chlor des Hämins allmählich aus nicht-ionogener Bindung in den ionisierten Zustand übergeht. Das Hämin verwandelt sich dabei gleichzeitig in Hämatin; dies ist auch eine Erklärung dafür, daß Brom-, Jod-, Rhodanhämin ebenso wie Hämatin die gleiche Wirksamkeit haben wie Chlorhämin; wahrscheinlich ist der wirksame Katalysator unter den gewöhnlichen Reaktionsbedingungen stets Hämatin, nur in saurer Lösung werden nichtgealterte Häminlösungen wenigstens partiell noch als Hämin vorliegen.

---

[121]) Außerdem bestehen sicherlich bei den Blutfarbstoffderivaten zwischen dem Eisen und andern Stellen des Moleküls Beziehungen im Sinne der A. Wernerschen Koordinationslehre. Doch können wir Genaueres über die Art dieser Beziehungen nicht aussagen (wahrscheinlich spielen die Stickstoffatome dabei eine Rolle), und es ist ja noch nicht einmal feststehend, welche Blutfarbstoffderivate zu den koordinativ gesättigten und welche zu den koordinativ ungesättigten Verbindungen zu zählen sind. (Wahrscheinlich sind die, die Molverbindungen mit O_2, NO und CO geben, koordinativ ungesättigt.) Über neuere Anschauungen von W. Dilthey und R. Wizinger über Beziehungen zwischen Farbigkeit und koordinativem Ungesättigtsein vgl. W. Dilthey, Journ. prakt. Chemie (2) **109**, 273 (1925) und R. Wizinger, Zeitschr. f. angew. Chemie **40**, 503 (1927).

I. Das „Pyridinhämin".

Noch komplizierter sind die Vorgänge beim Auflösen des Hämins in Pyridin. Während der Auflösung des Hämins in Alkalien ein unscharfes und wenig typisches Spektrum zukommt, so hat die Auflösung von Hämin in Pyridin ein scharfes, dem Hämochromogen-Spektrum sehr ähnelndes Spektrum. Trotzdem ist bei der Auflösung in Pyridin nicht etwa eine Reduktion des Hämins zum Hämochromogen erfolgt. Am eindeutigsten wird dies bewiesen durch die von F. Haurowitz[122]) gefundene Tatsache, daß in Pyridin gelöstes Hämin ebensoviel Hydrazin zur Reduktion verbraucht wie in Natronlauge gelöstes; in beiden Fällen wird, wie bei der Reduktion von einer Ferri- zu einer Ferroverbindung zu erwarten ist, pro Mol Hämin $^1/_4$ Mol Stickstoff entwickelt. Noch vor dem Erscheinen der Arbeit von F. Haurowitz hatte ich versucht, festzustellen, ob bei der Auflösung des Hämins in Pyridin nicht etwa doch eine Reduktion stattgefunden hat, worauf die Ähnlichkeit der Absorptionsspektra der Pyridinlösung des Hämins und des Hämochromogens hinzudeuten schien. Es ist zwar wenig wahrscheinlich, daß Pyridin als Reduktionsmittel wirkt; wenn aber eine derartige Reduktion überhaupt möglich sein sollte, so müßten gleichzeitig aus dem Pyridin Dipyridyle entstehen. $\alpha\alpha'$ Dipyridyl würde sich sofort durch die sehr empfindliche Reaktion mit Ferro-ion erkennen lassen; es läßt sich aber auch nicht die geringste Spur von $\alpha\alpha'$ Dipyridyl in Pyridin, das zur Auflösung von Hämin benützt worden ist, nachweisen. Aber auch die isomeren Dipyridyle sind nicht entstanden. Ich habe den Versuch, etwa entstandene Dipyridyle nachzuweisen, mit ziemlich großen Substanzmengen unternommen. 100 g Hämin wurden in 250 ccm Pyridin, das vorher destilliert und dadurch von allen höher siedenden Bestandteilen befreit war, gelöst; die Lösung, die die Neigung hat breiig zu werden, wurde mit heißem Wasser verdünnt, das Hämatin dann durch Zusatz eines Überschusses von 20%iger Salzsäure gefällt und auf der Nutsche abgesaugt. Die klare, stark saure Lösung wurde dann auf dem Wasserbade bis auf ca. 500 ccm konzentriert, hierbei verstärkte sich die zuerst ganz schwache blau-violette Färbung der Lösung; ich habe den entstandenen Farbstoff spektroskopisch untersucht; das

[122]) H. **164**, 255 (1927). Durch diese Arbeit werden die geistvollen Spekulationen W. J. Dillings in seinem „Atlas der Hämochromogene" (Stuttgart 1910) über die Bildung des Hämochromogens durch Einwirkung von Pyridin auf Hämatin endgültig widerlegt. R. v. Zeynek (H. **30**, 132, 1900) hat also mit seiner Behauptung, durch Einwirken von Pyridin auf Hämatin entstehe nur ein dem Hämochromogen ähnlicher Stoff, nicht Hämochromogen selbst, Recht behalten.

gänzlich anders geartete Absorptionsspektrum macht es unwahrscheinlich, daß es sich um ein Blutfarbstoffderivat handelt. Die Gesamtmenge des entstandenen Farbstoffes ist sehr klein, wahrscheinlich nur einige Milligramme oder noch weniger; da jedes Pyridin auch nach sorgfältiger Destillation noch geringe Mengen höherer Homologe des Pyridins enthält, so ist die geringe Menge Farbstoff wahrscheinlich durch Oxydation eines Pyridinhomologen (evtl. katalytisch beschleunigt durch das Hämin) entstanden. Nach dem Abkühlen des Konzentrates wurde vorsichtig mit 50%iger Natronlauge neutralisiert; hierbei schieden sich kleine Mengen brauner Flocken ab (wahrscheinlich ein Umwandlungsprodukt des violetten Farbstoffs; Eisen enthielten die braunen Flocken nicht). Die Hauptmenge des Pyridins sammelte sich, braun gefärbt, oben an; die stark alkalische konzentrierte Kochsalzlösung löst nur noch wenig Pyridin. Sie wurde aber nach dem Ablassen im Scheidetrichter noch 24 Stunden im Flüssigkeitsextraktor mit Äther extrahiert, der Äther dann abdestilliert und der Rückstand mit der Hauptmenge des Pyridins vereinigt. Das gesamte Pyridin — 235 ccm, anstatt der angewandten 250 ccm — wurde dann sorgfältig fraktioniert destilliert; es gelang aber nicht, einen höher siedenden Anteil zu isolieren, die Gesamtmenge des Pyridins ging zwischen 113° und 115° über; im Kolben blieb nur eine minimale Menge Harz zurück. Eine größere Menge Dipyridyl hätte mir kaum entgehen können, und wenn das Hämin auf Kosten des Pyridins reduziert worden wäre, so hätten über 12 g Dipyridyle entstehen müssen. Mein negativer Befund, dem aber natürlich, wie allen negativen Befunden nur geringe Beweiskraft zukommt, steht in völliger Übereinstimmung mit dem Ergebnis der direkten Reduktionsversuche von F. Haurowitz.

Daß aber das Hämin bei der Auflösung in Pyridin doch eine einschneidende Veränderung erleidet, beweist nicht nur die Änderung des Absorptionsspektrums, sondern auch die sehr erhebliche Zunahme der katalatischen und peroxydatischen Wirksamkeit. Der Versuch einer Deutung, der bei der Auflösung des Hämins sich abspielenden Vorgänge ist von W. Küster[123]) unternommen worden. Er nimmt an, daß unter dem Einfluß des alkalischen Mediums das Chlor bzw. das Hydroxyl[124]) in die Seitenketten abwandere, und daß dadurch ein hämochromogenartiges Radikal entstände. In natron-alkalischer Lösung ist das so ent-

---

[123]) B. **58**, 2851 (1925).

[124]) Es sei erwähnt, daß ich die Beobachtung gemacht habe, daß man bei der Verwendung von sehr scharf getrocknetem Pyridin kein scharfes Spektrum erhält. Vielleicht bewirkt ein geringer Wassergehalt des Pyridins (0,0003% würden genügen), daß das Chlor gegen Hydroxyl ausgetauscht wird und evtl. ist nur das Hydroxyl zum Abwandern in die Seitenkette befähigt.

stehende Radikal so sauerstoffempfindlich, daß schon die in dem Alkali gelöste Luft zur Oxydation ausreiche, und die dadurch hervorgerufene irreversible Veränderung des Moleküls bewirke auch, daß einmal in Alkali gelöstes Hämin nicht in kristallisiertes Hämin zurückverwandelt werden kann[125]). Unter ganz besonderen Vorsichtsmaßregeln (Arbeiten im Vakuum) ist es aber W. Küster[126]) gelungen, auch bei der Auflösung von Hämin in Alkali einen roten hämochromogenartigen Körper zu erhalten, den er aber leider wegen seiner großen Empfindlichkeit noch nicht näher hat untersuchen können. In Pyridinlösung ist wahrscheinlich infolge Komplexbildung das entstehende Radikal weitaus unempfindlicher gegen Oxydation; stärkere Oxydationsmittel (Hyperoxyd) bewirken aber doch allmählich eine Oxydation, wie der Farbumschlag und das schnelle Abfallen der Reaktionskonstanten bei der katalatischen Wirkung des in Pyridin gelösten Hämins beweist.

K. Das „Perhydrohämin".

Es muß übrigens erwähnt werden, daß außer dem Dihydrohämin auch noch ein höher hydriertes Hydrierungsprodukt des Hämins existiert, das „Perhydrohämin"[126a]). Um das „Perhydrohämin" zu erhalten, muß man Hämin, das in einem Gemisch von Piperidin und Chloroform gelöst ist, nach R. Adams und R. L. Shriner[127]) mit Platinoxyd hydrieren. Es werden dann ca. 10 Mol Wasserstoff aufgenommen, während, wie schon erwähnt, bei der Verwendung von anderen Katalysatoren die Hydrierung immer nach der Aufnahme von einem Mol Wasserstoff zum Stillstand kommt[128]). Das „Perhydrohämin" ist leider noch nicht kristallisiert erhalten worden. Es ist im Gegensatz zum Hämin, Dihydrohämin und Mesohämin in den meisten organischen

---

[125]) Siehe Fußnote 57 S. 20.

[126]) B. **58**, 2851 (1925). Ganz neuerdings (B. **60**, 1139, 1927) mußte W. Küster seine in der ersten Arbeit gezogenen Schlußfolgerungen einschränken, da sein Mitarbeiter W. Clement aus völlig unverständlichen Gründen falsche Angaben über seine Versuchsresultate gemacht hatte.

[126a]) H. Fischers Einwände gegen die Hydrierung des Hämins mit PtO_2 beruhen auf einem Irrtum von ihm; wir haben nicht Pyridin, sondern Piperidin als Lösungsmittel genommen, da auch wir die Erfahrung gemacht hatten, daß in Gegenwart von PtO_2 Pyridin große Mengen Wasserstoff aufnimmt.

[127]) Am. Soc. **45**, 2071 (1923).

[128]) In Übereinstimmung mit H. Wieland u. E. Martz, B. **59**, 2352 (1926), hat sich auch in diesem Fall das Platinoxyd als der weitaus wirksamste Hydrierungskatalysator erwiesen. Es bewirkt auch die Hydrierung von Pyridin, so daß dieses nicht als Lösungsmittel verwandt werden konnte; Piperidin-Chloroformgemische verbrauchen aber, wie im Leerversuch festgestellt worden ist, selbst in Gegenwart von Platinoxyd keinen Wasserstoff.

Lösungsmitteln leicht löslich; vor allem aber wird es auch von Säuren glatt gelöst, in denen ja Hämin vollkommen unlöslich ist. Es ist nicht ausgeschlossen, daß im „Perhydrohämin" evtl. alle vier Pyrrolringe zu Pyrrolidinen reduziert worden sind, wodurch die Entstehung der basischen Eigenschaften erklärt würde; wenn man annimmt, daß auch die ungesättigten Seitenketten vollständig reduziert worden sind, so würde sich der hohe Wasserstoffverbrauch erklären. Die Methingruppen des Porphinskeletts scheinen aber wohl noch erhalten zu sein, denn sie sind ja wohl in erster Linie die Träger des Farbstoffcharakters (das „Perhydrohämin" hat dasselbe Absorptionsspektrum wie das Mesohämin). Im Mesoporphyrinogen, das ja bekanntlich farblos ist, sind wahrscheinlich die Methingruppen reduziert; mit dem Farbstoffcharakter geht auch die Fähigkeit, komplexe Metallsalze zu bilden, verloren[129]), während scheinbar die Hydrierung der Pyrrolringe diese Fähigkeit nicht herabmindert. Im Gegensatz zu allen anderen häminartigen Verbindungen wirkt das „Perhydrohämin" nicht katalatisch[129a]), was ein Zeichen dafür ist, daß das „Perhydrohämin", trotzdem es das gleiche Absorptionsspektrum wie das Mesohämin hat, doch einen wesentlich anderen Verbindungstypus angehört als das Hämin und das Mesohämin. Wenn das „Perhydrohämin", wie anzunehmen ist, die Eisenkomplexverbindung eines porphyrinartigen Körpers, der von vier Pyrrolidinen gebildet wird, ist, so wäre es der erste Vertreter einer neuartigen Körperklasse.

V. Kapitel.

Magnetische Messungen.

Anschließend an die Darlegungen über die Konstitution des Hämins seien die Überlegungen angeführt, die mich zu einer Untersuchung der magnetischen Suszeptibilitäten der von mir auf ihre katalytische Wirksamkeit untersuchten Substanzen veranlaßten. Von O. Baudisch und L. A. Welo[130]) ist in einer größeren Reihe von Arbeiten festgestellt worden, daß Hämatite, die sich nur in ihrer durch röntgenographische Messungen bestimmten Kristallfeinstruktur unterscheiden, die aber chemisch untersucht genau die gleichen Analysenresultate ergeben, in ihrem magnetischen und katalytischen Verhalten starke Unterschiede zeigen.

---

[129]) H. Fischer, H. Röse u. E. Bartholomäus, H. **84**, 262 (1913).

[129a]) Selbst nicht in 75% Pyridin, wo alle andern Präparate eine besonders große Wirksamkeit zeigen.

[130]) Zusammenfassende Aufsätze der Autoren selbst über die in amerikanischen, schwer zugänglichen Publikationen erschienenen Originalarbeite finden sich in den „Naturwissenschaften" **13**, 749 (1925) und **14**, 1005 (1926) und in der „Chemikerzeitung" **49**, 661 (1925).

Starker Paramagnetismus und katalytische Wirksamkeit eignen dem in kubischen Kristallen kristallisierten Fe_2O_3, äußerst geringe Suszeptibilität mit negativem Vorzeichen und katalytische Unwirksamkeit dem rhomboedrisch kristallisierten Fe_2O_3. Das aktive Fe_2O_3 wird aus dem Magnetit bei niederer Temperatur (200—300°) erhalten; es hat dasselbe kubische Kristallgitter wie das angewandte Fe_3O_4; das inaktive Fe_2O_3 geht aus dem aktiven durch stärkeres Erhitzen (550°) hervor. Hierbei findet auch die Kristallgitterumformung in die rhomboedrische Anordnung statt. Baudisch und Welo nehmen an, daß sowohl die magnetischen wie die katalytischen Eigenschaften Funktionen der Atom- und Elektronenanordnung im Kristall und Molekül sind. Wenn auch die katalytische Wirksamkeit nicht etwa direkt eine Funktion der magnetischen Eigenschaften ist, so soll doch zwischen beiden Größen eine weitgehende Parallelität bestehen. Nur die Kristallfeinstruktur und die magnetische Suszeptibilität der verschiedenen Eisenoxyde sind quantitativ von Baudisch und Welo untersucht worden. Bei der Untersuchung der katalytischen Eigenschaften begnügen sich die Autoren mit mehr qualitativen Beobachtungen (Benzidinreaktion und Erhöhung der Vermehrung und Virulenz von Bakterien). Sie geben an, daß es nicht wahrscheinlich ist, daß die beobachtete Verschiedenheit der katalytischen Eigenschaften auf Unterschiede in Korngröße und Absorptionsfähigkeit der untersuchten Eisenoxyde beruht, denn gemessen durch die Absorptionsfähigkeit für Wasser erweist sich das inaktive Fe_2O_3 als das absorptionstüchtigere. Im Gegensatz hierzu erweist sich nur das aktive Fe_2O_3 befähigt, Sauerstoff zu absorbieren. Hierfür sind aber wohl nicht Oberflächenkräfte verantwortlich zu machen, sondern die Art des Kristallgitters; der Sauerstoff wird nicht nur durch physikalische Kräfte, sondern auch durch chemische festgehalten (wahrscheinlich beruht aber auch die Wirksamkeit des aktiven Fe_2O_3 in den Bakterienversuchen auf der Fähigkeit der Sauerstoffabsorption und der dadurch bedingten Schaffung anaerobiontischer Lebensbedingungen).

Im Gegensatz zu Baudisch und Welo besaß ich durch quantitative Messungen an echt gelösten Eisenverbindungen, bei denen also Verschiedenheiten der aktiven Oberflächen nicht in Betracht kommen konnten, ein genaues Maß für ihre katalytische Wirksamkeit, und so wäre es von großem Interesse gewesen, durch quantitative magnetische Messungen womöglich zahlenmäßige Beziehungen zwischen beiden Erscheinungen aufzudecken. Es muß übrigens erwähnt werden, daß aus rein atomtheoretischen Überlegungen von G. N. Lewis[131]) die Theorie

[131]) Magnetochemische Theorie in Chem. Reviews **1**, 231 (1924) und N. W. Taylor u. G. N. Lewis, Ber. d. Nat. Academy of Science, 15. 8. 1925

aufgestellt worden ist, daß alle Verbindungen mit ungerader Elektronenzahl paramagnetisch seien. Ungerade Elektronenzahlen haben nun alle Verbindungen, in denen ein Element mit gerader Ordnungszahl eine ungerade Valenzzahl oder ein Element mit ungerader Ordnungszahl eine gerade Valenzzahl betätigt. (Z. B. ClO_2, NO, NO_2, organische Radikale, Cupriverbindungen; hierfür als Zahlenbeispiel: $CuSO_4$, das 77 Elektronen hat, hat eine Suszeptibilität von $+ 36 \cdot 10^{-6}$, während Cu_2Br_2 als Cuproverbindung eine gerade Elektronenzahl, 128, hat und eine Suszeptibilität von $- 0{,}76 \cdot 10^{-6}$.) Wichtig ist, daß die Lewis sche Regel nicht umkehrbar ist; es gibt auch Verbindungen mit gerader Elektronenzahl, die paramagnetisch sind, z. B. O_2, das 16 Elektronen hat. Da Eisen die Ordnungszahl 26 hat, sollen nach der Lewis schen Regel alle Ferriverbindungen paramagnetisch sein, so auch das Hämin, das 337 Elektronen hat. Die Nichtumkehrbarkeit der Lewis schen Regel läßt bei Ferroverbindungen eine Voraussage über das Vorzeichen der Suszeptibilität nicht zu. Wie sehr es bei den Ferroverbindungen auf die spezielle Elektronenanordnung ankommt, kann man aus folgendem Beispiel ersehen: Ferrocyankalium (180 Elektronen) ist eine der wenigen diamagnetischen Eisenverbindungen; das nahe verwandte Ferro-penta-cyan-aquo-natrium von K. A. Hofmann[132]) $[Fe(CN)_5 H_2O]Na_3$ (134 Elektronen) ist stark paramagnetisch. Über den magnetischen Charakter des Hämoglobins und Hämochromogens, in denen das Eisen zweiwertig ist, läßt sich von vornherein keine Aussage machen, wenn auch das radikalartige Verhalten beider Verbindungen und ihre Fähigkeit katalytisch zu wirken es eigentlich wahrscheinlich erscheinen lassen, daß sie paramagnetisch sind. Aber schon M. Faraday hatte bemerkt, daß das Blut diamagnetisch ist und durch ältere Messungen von A. Gamgee[133]) und durch neuere von F. Haurowitz[134]) war es erwiesen, daß der genuine Blutfarbstoff, das Oxyhämoglobin, diamagnetisch ist, während die abgespaltene prosthetische Gruppe[135]) stark paramagnetisch ist. Übrigens soll nach A. Gamgee auch Methämoglobin diamagnetisch sein; da im Methämoglobin das Eisen in der Ferristufe vorliegt, so scheint dies gegen die Lewis sche Regel zu verstoßen. Vielleicht aber kommt der Diamagnetismus des Methämoglobins dadurch zustande, daß der Diamagnetismus der großen Globinkomponente den Paramagnetismus des Ferrieisens überwiegt,

(siehe „Naturwissenschaften" **13**, 876 (1925). Vgl. auch R. Ladenburg, Ph. Ch. **126**, 313 (1927).

[132]) A. **312**, 1 (1900).

[133]) Proc. of the Roy. Soc. **68**, 503 (1901).

[134]) H. **137**, 69 (1924).

[135]) Haurowitz verwandte das auf sehr schonende Weise aus HbO_2 dargestellte Zeyneksche Verdauungshämatin (H. **30**, 126, 1900).

denn nach P. Pascal[136]) ist die Suszeptibilität eine additive Größe. So ist vielleicht auch die Tatsache, daß genuiner Blutfarbstoff und prosthetische Gruppe entgegengesetzten Magnetismus besitzen, trotzdem ja beide katalytisch wirksam sind, nur ein scheinbarer Widerspruch zur Theorie von Baudisch und Welo, der ebenfalls durch den additiven Charakter der Suszeptibilität seine Erklärung findet[137]).

Haurowitz Bestimmungen der Suszeptibilität sind ebenso wie die von A. Gamgee nur qualitativ; er hat aus dem zu untersuchenden Material Stäbchen gepreßt, sie zwischen die Pole eines Elektromagneten aufgehängt und ihre Ausrichtung beim Einschalten des Magnetfeldes beobachtet. Ich habe versucht, zwei der vielbenützten Methoden zur quantitativen Bestimmung der Suszeptibilität auch auf die Blutfarbstoffderivate anzuwenden, habe aber keine gut reproduzierbaren Werte erhalten können. Es scheint noch keine geeignete physikalische Methode zu geben, um quantitativ die Suszeptibilität hochmolekularer und farbstoffartiger Stoffe zu bestimmen; vielleicht ließe sich aber durch irgendwelche geeigneten Versuchsanordnungen eine der vorhandenen Methoden so umformen, daß sie sich auch für diese Zwecke eignet, und es wäre begrüßenswert, wenn von physikalischer Seite aus diese Aufgabe gelöst würde.

Zur quantitativen Bestimmung der Suszeptibilität bzw. Permeabilität[138]) habe ich zuerst die Quinckesche[139]) Steighöhenmethode angewandt. Bei dieser Methode, die speziell für Flüssigkeiten bzw. Lösungen angewandt wird, wird die Niveauverschiebung, die in einer zwischen den Polen des Elektromagneten befindlichen Kapillare durch Einschaltung des magnetischen Feldes bewirkt wird, beobachtet. (Bei paramagnetischen Substanzen wird der Meniskus in das Magnetfeld hineingezogen, bei diamagnetischen wird er hinausgestoßen.)

Es gilt dann folgende Gleichung:

$$(1) \qquad \frac{1}{2}(\varkappa - \varkappa') \cdot H^2 = h \cdot g \cdot d$$

---

[136]) C. R. **180**, 664 (1925).

[137]) F. Haurowitz (H. **151**, 140, 1926) hat auch schon diesen Widerspruch bemerkt. Es scheint ihm aber ein Irrtum unterlaufen zu sein, denn er hebt den Diamagnetismus des HbO_2 als mit Baudisch u. Welos Theorie in Übereinstimmung stehend hervor, während das doch gerade der Widerspruch ist.

[138]) Die beiden Größen sind durch die beiden Gleichungen $B = \mu \cdot H$ und $\mu = 1 + 4\,\pi \cdot \varkappa$ definiert, wo B = Induktion, H = Feldstärke, μ = Permeabilität und $\varkappa$ = Suszeptibilität ist; bei paramagnetischen Stoffen ist $\varkappa$ positiv, bei diamagnetischen negativ. (Siehe O. D. Chwolson, Lehrb. d. Physik 1. Aufl. Bd. 4 Teil I S. 398 ff.)

[139]) Wiedemanns Annalen **347** (1885).

wo $\varkappa$ die Suszeptibilität der Flüssigkeit, $\varkappa'$ die der Luft bzw. des Gases, in dem gemessen wird, bedeutet, H die Feldstärke (in meinem Fall 30000 Gauß bzw. 3000 C. G. S.-Einheiten), h die Niveauverschiebung, g die Gravitationskonstante und d die Dichte der Flüssigkeit. Aus dem $\varkappa$ für die Lösung kann man die Suszeptibilität des gelösten Körpers, das $\varkappa_S$ nach folgender Formel ausrechnen:

$$\varkappa_S = \frac{100}{p} \cdot \varkappa + 0{,}7193 \cdot 10^{-6} \left(\frac{100}{p} - 1 \right), \tag{2}$$

wo p die Anzahl Gramme in hundert Gramm Lösung ist, und $-0{,}7193 \cdot 10^{-6}$ die Suszeptibilität des Wassers bei 18° ist. Zum besseren Vergleich verschiedener Substanzen miteinander kann man auch noch die molekulare Suszeptibilität K heranziehen. Es ist:

$$K = \frac{\varkappa_S \cdot M}{d} \tag{3}$$

wo M das Molekulargewicht und d die Dichte der untersuchten Substanz ist.

Leider erhielt ich nach der Quinckeschen Methode bei Versuchen mit Lösungen von Blutfarbstoffderivaten, die eine große Adhäsion an den Kapillarwänden haben, keine reproduzierbaren Werte. Ich habe übrigens unreproduzierbare Resultate nicht nur beim Blutfarbstoff, sondern auch bei der Blauschen Verbindung (Tri-$\alpha\alpha'$-dipyridyl-ferrobromid) erhalten. Ich vermute, daß die Unreproduzierbarkeit der Resultate auf kleinsten Verunreinigungen der Lösungen beruht; aber diese Annahme erwies sich als nicht richtig, denn auch nach Ultrafiltration der Lösung der Blauschen Verbindung waren die erhaltenen Werte nicht reproduzierbar. Der durch das Einschalten des Magnetfeldes verschobene Meniskus kehrte nach Ausschalten des Feldes nicht mehr zu seiner ursprünglichen Lage zurück, sondern wurde durch Adhäsion an den Kapillarwänden in der verschobenen Lage zurückgehalten. Durch vorsichtiges Klopfen an den Kapillarwandungen konnte man wohl ein Herabsinken des Meniskuses bewirken, aber die eingenommene Stellung erwies sich als zufällige, und die bei einem neuen Einschalten des Feldes sich ergebende Steighöhe desgleichen. Es ließen sich aus diesem Grunde nach dieser Methode keine zuverlässigen Resultate gewinnen.

Ich bin dann zu der sogenannten Faradayschen Differentialmethode übergegangen, und zwar in der besonderen, durch E. Becquerel[140]) ausgebildeten Form. Es wird in diesem Fall die Suszeptibilität eines Probekörpers bei bekannter Feldstärke einmal in einem

[140]) An. de Chim. et Phys. (3), **32**, 68 (1851).

Medium bekannter Suszeptibilität, das andere Mal in dem unbekannter Suszeptibilität untersucht. Es gilt dann die Gleichung:

$$\varkappa = \varkappa_1 - \varkappa_2 + 0{,}024 \cdot 10^{-6} \tag{4}$$

wo $\varkappa_1$ die gemessene Suszeptibilität des Probekörpers im ersten Medium (Luft), $\varkappa_2$ die gemessene Suszeptibilität des Probekörpers im zweiten Medium, $0{,}024 \cdot 10^{-6}$ die Suszeptibilität der Luft (Permeabilität des Äthers $= 1$), und $\varkappa$ die Suszeptibilität des zu untersuchenden Mediums ist. Der Übergang von der verdünnten Lösung zum festen Körper und die Umrechnung auf molare Suszeptibilität geschieht, wie im ersten Fall, nach Gleichung 2 und 3. Die Suszeptibilität des Probekörpers, eines kleinen, an einem Quarzfaden aufgehängten Glasstäbchens, wurde nach der Torsionsmethode, die ebenfalls von E. Becquerel[141]) angegeben worden ist, gemessen. Die Torsion des Quarzfadens durch die magnetische Kraft wird durch das Drehen des Torsionskopfes, an dem der Quarzfaden befestigt ist, wieder kompensiert. Ob die ursprüngliche Stellung wieder erreicht worden war, wurde mit Hilfe eines kleinen, am Quarzfaden festgekitteten Spiegels, der zur Reflektion eines Lichtstrahls dient, festgestellt. Die Winkel, um die der Torsionskopf gedreht werden muß, bis die ursprüngliche Stellung wieder erreicht ist, sind ein Maß für die Suszeptibilitäten des Stäbchens in den verschiedenen Medien. (Diese ist in verschiedenen Medien verschieden, wie z. B. auch der Auftrieb, den ein Körper erfährt, verschieden ist, je nach der Flüssigkeit, in die man ihn hineintaucht.) Durch Bestimmung des Torsionswinkels in Luft und Wasser kann man die Eigen-suszeptibilität des Stäbchens und eine Apparatenkonstante berechnen, mit deren Hilfe man unter Ausschaltung der Gleichung 4 direkt aus dem Torsionswinkel φ in dem zu untersuchenden Medium dessen Suszeptibilität ermitteln kann. Es gilt die Gleichung:

$$\varkappa = \varphi \frac{\varkappa_L - \varkappa_W}{\varphi_L - \varphi_W} + \frac{\varkappa_L \cdot \varphi_W - \varkappa_W \cdot \varphi_L}{\varphi_W - \varphi_L}, \tag{5}$$

die sich zwecks einfacherer Durchführung der Rechnung in die drei Gleichungen 6, 7 und 8 zerlegen läßt:

$$\varkappa = \varphi \cdot C + \varkappa_G \tag{6}$$

$$C = \frac{\varkappa_L - \varkappa_W}{\varphi_L - \varphi_W} \tag{7}$$

$$\varkappa_G = \frac{\varkappa_L \cdot \varphi_W - \varkappa_W \cdot \varphi_L}{\varphi_W - \varphi_L} \tag{8}$$

es bedeutet in diesen Gleichungen $\varkappa_W$ Eigensuszeptibilität des Stäbchens, $\varkappa_L$ Suszeptibilität der Luft bei 18° ($+ 0{,}024 \cdot 10^{-6}$), $\varkappa_W$ Suszeptibilität

[141]) An. de Chim. et Phys. (3), **28**, 283 (1850).

des Wassers bei 18° ($-0{,}7193 \cdot 10^{-6}$), φ_L und φ_W die gemessenen Torsionswinkel in Luft und Wasser, C die Apparatenkonstante, φ der Torsionswinkel im zu untersuchenden Medium und $\varkappa$ die gesuchte Suszeptibilität. In der benutzten Apparatur waren bei 18° und bei der angewandten Feldstärke von 20000 Gauß = 2000 C. G.S.-Einheiten $\varphi_L = +149°$, $\varphi_W = -185{,}1°$, $\varkappa_C = -0{,}3075 \cdot 10^{-6}$ und $C = 0{,}22248 \cdot 10^{-8}$. Für eine 0,1215%ige Lösung der Blauschen Verbindung erhielt ich ein $\varphi = -185{,}4°$; für eine 0,1%ige Lösung von Hämin in 2,8412%igem $Na_2HPO_4\left(\frac{m}{50}\right)$ $\varphi = -180{,}4°$, für die 2,8413%ige Phosphatlösung ergab sich $\varphi = -187{,}1°$. Die angewandte Feldstärke ist ohne Einfluß auf den Wert von $\varkappa$, wenigstens bei schwach magnetischen Stoffen, ganz im Gegensatz zu den Verhältnissen bei den ferromagnetischen Stoffen. Der Temperaturkoeffizient von $\varkappa$ ist negativ; der absoluten Größe nach stimmt er ungefähr mit dem Ausdehnungskoeffizient der Gase überein; es ist also $\varkappa$ umgekehrt proportional der absoluten Temperatur. Leider waren aber auch bei dieser Methode die Messungen sehr schlecht reproduzierbar; die Blausche Verbindung konnte ganz gut gemessen werden; erst beim Hämin ergab sich die schlechte Reproduzierbarkeit, und als nachher das φ_W wieder gemessen wurde, hatte sich dieses so stark verschoben, daß die ganze Messung wertlos geworden war. Worauf dieses merkwürdige Phänomen zurückzuführen ist, ist schwer erklärlich; erst nach Tagen hatte der Apparat wieder die alte Konstante; ein nochmaliger Versuch scheiterte ebenfalls; sobald Häminlösungen in den Apparat hinein kamen, verlor er die sonst vorzügliche Reproduzierbarkeit seiner Messungen. (Er wurde verwandt zur Bestimmung von Suszeptibilitäten verdünnter Alkali-halogenid-lösungen.) Ob dieses Versagen des Apparats beim Hämin durch Absorption einer Farbstoffschicht am Glasstäbchen oder durch Herausbildung eines Wandpotentials bzw. Aufladung des Stäbchens in der schwach alkalischen Phosphatlösung (pH 7,93) zu erklären ist, konnte nicht festgestellt werden; für die zuletzt erwähnte Möglichkeit spricht die Tatsache, daß auch in häminfreier Na_2HPO_4-Lösung sich diese Schwierigkeiten ergaben, während die neutralen Lösungen der Blauschen Verbindung ganz gut meßbar waren. Da die meisten Derivate des Blutfarbstoffs sich nur in alkalischen Medien lösen lassen, so erwies sich auch diese Methode als unzulänglich. Nach diesen beiden Fehlschlägen gab ich die Versuche, die magnetischen Eigenschaften meiner Substanzen quantitativ zu bestimmen, auf. Unter den weitgehendsten Vorbehalten gebe ich aus den oben angeführten Messungen für die Blausche Verbindung und für das Hämin folgende Suszeptibilitäten an:

Blausche Verbindung	Hämin
$\varkappa = -1{,}3 \cdot 10^{-6}$	$\varkappa = +14{,}6 \cdot 10^{-6}$.

Ich habe die Suszeptibilität nicht auf molare Suszeptibilitäten umrechnen können, da mir die spezifischen Gewichte der Substanzen nicht bekannt waren, und ich diese, da ja die gemessenen Suszeptibilitäten keinen Anspruch auf große Genauigkeit erheben können, nicht extra diesem Zweck bestimmt habe.

Wenn ich also auch infolge der angeführten Schwierigkeiten das erstrebte Ziel, zahlenmäßige Beziehungen zwischen magnetischen Suszeptibilitäten und katalytischen Wirksamkeiten aufzufinden, nicht erreichen konnte, so geht doch aus den oben angeführten Zahlen folgendes hervor:

Hämin, das katalytisch wirksam ist, ist stark paramagnetisch; die katalytisch unwirksame Blausche Verbindung ist schwach diamagnetisch. Dies Ergebnis stimmt also mit der Hypothese von Baudisch und Welo überein. Endgültiges wird sich aber über diese Hypothese erst sagen lassen, wenn die magnetischen Meßmethoden auch für die Körper der Blutfarbstoffchemie zu größerer Exaktheit ausgebildet sind, und dann zahlreicheres und genaueres Versuchsmaterial vorliegt.

Die Messungen nach der Steighöhen-methode wurden im Institut von Herrn Geheimrat Professor Dr. W. Wien, die nach der Torsionsmethode im Institut von Herrn Geheimrat Professor Dr. J. Zenneck vorgenommen. Den beiden Herren Geheimräten, und vor allem den Herren Dr. Glaser, Dr. Kuhlenkamp und Ickenmeyer, die mir in entgegenkommendster Weise bei der Ausführung dieser Bestimmungen behilflich waren, bin ich zu größtem Dank verpflichtet, den ich auch an dieser Stelle aussprechen möchte.

VI. Kapitel.

Spektroskopische Messungen.

Weitere physikalische Eigenschaften der Blutfarbstoffderivate, denen ich mein Interesse zugewandt habe, sind die Absorptionsspektren und die optischen Eigenschaften der Kristalle. Die vorläufig gewonnenen Resultate sind noch nicht genügend zahlreich, um irgendwelche Beziehungen dieser physikalischen Daten untereinander oder zu den katalytischen Wirksamkeiten formulieren zu können. Sie zeigen aber immerhin, daß sich konstitutionelle Einflüsse bei verschiedenen physikalischen Eigenschaften in recht verschiedener Art auswirken.

Die Absorptionsspektren wurden mit einem großen Gitterspektrographen nach Zeiss-Formanek[142]) gemessen. Die verwandten Lösungen waren 0,01%ig; als Lösungsmittel diente Pyridin reinst, das noch durch Destillation über Bariumoxyd entwässert worden war[143]).

In der Tabelle werden die Schwerpunkte der Absorptionsbänder angeführt; die eingesetzten Werte sind Mittelwerte einer größeren Anzahl von Bestimmungen; die Abweichungen der einzelnen Ablesungen, und damit auch die Fehlergrenzen, betragen höchstens $\pm 1 \mu\mu$. Um etwaige Fehler durch eine evtl. Verschiebung der Skala im Apparat zu vermeiden, wurde des öftern das Absorptionsspektrum des Hämins von neuem bestimmt und die erhaltenen Zahlen mit der ersten Messung verglichen. Mit einer einzigen Ausnahme waren besondere Korrekturen nicht nötig, da die Werte für Hämin unverändert blieben. Eine Eichung des Apparats mit einem genau bekannten Linienspektrum habe ich nicht durchgeführt; es handelte sich ja auch in erster Linie darum, Relativwerte zu bekommen, daß aber die von mir gefundenen Werte den wahren Absolutwerten weitgehend nahekommen, beweist die gute Übereinstimmung mit den von W. J. Dilling[144]) angegebenen Werten.

---

[142]) Ausführliche Beschreibung bei H. E. Fierz-David, Künstl. organ. Farbstoffe (Berlin [J. Springer] 1926 S. 644 ff.).

[143]) Bei Verwendung von ganz besonders sorgfältig getrocknetem Pyridin (hierzu war mehrtägiges Stehen über Bariumoxyd und dreimaliges Destillieren über jeweils frischem Bariumoxyd notwendig) konnte ich nicht so scharfe Absorptionsspektren bekommen wie sonst; vielleicht ist zur Erzielung eines scharfen Absorptionsspektrums der Austausch des Halogens des Hämins gegen Hydroxyl notwendig; bei der Herstellung einer 0,01%igen Häminlösung würde ein evtl. Wassergehalt des Pyridins von 0,0003% genügen, um quantitativ diesen Austausch bewirken zu können. Es ist natürlich schwierig, so kleine Wassermengen mit Sicherheit auszuschließen, und aus diesem Grunde muß es noch offen bleiben, ob die gegebene Erklärung die richtige ist, oder ob etwa irgendwelche Zufälligkeiten die gemachte Beobachtung bedingt haben. Für die gegebene Erklärung spricht, daß nach Zusatz eines Tropfen Wassers zur Pyridinlösung das Spektrum scharf wurde.

[144]) W. J. Dilling, „Atlas der Kristallformen und der Absorptionsbänder der Hämochromogene", Stuttgart 1910, S. 50 u. 51. Aus dieser sehr reichhaltigen Zusammenstellung von Absorptionsspektren von Blutfarbstoffderivaten kann man ersehen, von wie großem Einfluß auf das Absorptionsspektrum die verschiedensten Umstände sind. So erhält man z. B. nicht identische Spektren, wenn man die Reduktion von Hämatin anstatt mit Schwefelammonium mit Hydrazinhydrat durchführt. Die von W. J. Dilling angegebenen Banden bei 400 $\mu\mu$ liegen schon im Ultravioletten, sind also nur der photographischen Aufnahme, nicht der direkten Beobachtung zugängig.

Tabelle der Absorptionsspektren:

Substanz[145])	Wellenlängen in $\mu\mu$					Intensitäten
Chlorhämin		557,0		526,7		annähernd gleich
Bromhämin		556,8		524,8		„ „
Jodhämin		557,0		522,3		„ „
Rhodanhämin		555,2		523,6		„ „
Dihydrohämin		557,3		526,7		„ „
Mesohämin			546,8		517,9	I stärker als II
„Perhydrohämin“			548,8		518,9	I stärker als II
Manganmesohämin	580,2		549,0		470,4	II stärker als III
						stärker als I
Kupfermesoporphyrin		563,1		526,3		I stärker als II
Mesoporphyrin	621,8	597,1	567,3	531,5	497,7	V stärker als IV
						stärker als III
						stärker als I
						stärker als II

(Die Numerierung der Banden in der letzten Spalte erfolgt so, daß die langwelligste die niedrigste Nummer bekommt.)

Die folgende Zusammenstellung zeigt, von wie erheblichem Einfluß auf das Absorptionsspektrum die Art des Lösungsmittels ist; die Lösungen waren sämtlich 0,01%ig an Hämin.

Substanz	Wellenlänge in $\mu\mu$		Intensitäten
Hämin in Pyridin	557,9	526,5	annähernd gleich
Hämin in Piperidin	556,2	526,2	I stärker als II
Hämin in Anilin	565,3	530,6	II stärker als I
Hämochromogen in sec. Phosphat	552,0	518,7	II stärker als I

Mehr noch als durch die Differenzen in der Lage der beiden Banden treten die Unterschiede durch die Verschiedenheiten der Intensitätsverhältnisse zutage; hiervon kann die qualitative Charakterisierung in der letzten Spalte nur ein recht unvollkommenes Bild geben. Das an vierter Stelle angeführte Hämochromogen-Spektrum wurde durch Reduktion von in sec. Phosphat gelöstem Hämin mit Hydrazinhydrat gewonnen; während vor Zusatz des Hydrazin-hydrats bei der angewandten starken Verdünnung überhaupt keine Absorption zu beobachten war, traten nach Zusatz des Reduktionsmittels die beiden Banden recht deutlich hervor. Die Ähnlichkeit des Hämochromogenspektrums mit dem von in organischen Basen gelösten Hämin ist unverkennbar. W. Dilling gibt an, daß zuerst die Auflösungen des Hämatins in organischen Basen ein anderes Spektrum zeigen, als das hier wiedergegebene Hämochromogenspektrum, das erst nach einiger

[145]) Über die Darstellung der verschiedenen Präparate siehe später bei den Untersuchungen ihrer katalytischen Eigenschaften.

Zeit auftreten soll; mir gelang es nicht, diese Beobachtung zu bestätigen, wahrscheinlich, weil ich nicht die spektrographischen Messungen an mikroskopischen Präparaten durchführen konnte und dadurch weit mehr Pyridin zur Auflösung des Hämins verwenden mußte als Dilling; Dilling gibt selbst an, daß man diese Beobachtung nur machen kann, wenn man sehr wenig Pyridin anwendet.

Aus der ersten Tabelle kann man ersehen, daß die Absorptionsspektra sämtlicher Halogenhämine einschließlich des Rhodanhämins innerhalb der Fehlergrenzen miteinander identisch sind; bei der kurzwelligeren Bande sind die Abweichungen etwas größer als bei der langwelligeren, doch liegt das wohl an der Tatsache, daß die kurzwelligere Bande ein wenig verschwommen ist und sich daher nicht ganz genau ablesen läßt[146]). Auch das Dihydrohämin ist durch das Absorptionssepktrum nicht vom Hämin zu unterscheiden. Die Reduzierung der Seitenketten (d. i. der Übergang vom Hämin zum Mesohämin) bewirkt eine Verschiebung beider Absorptionsbanden um je annähernd 10 $\mu\mu$ nach dem Kurzwelligeren hin. Das „Perhydrohämin", dessen Konstitution ja noch ziemlich ungeklärt ist, hat ein vom Mesohämin nicht unterscheidbares Spektrum. Dadurch wird die naheliegende Annahme unwahrscheinlich, daß bei der weitgehenden Reduktion zum „Perhydrohämin" das Eisen aus dem Molekül herausgespalten wird, und daß die hauptsächlich aus Eisenoxyd bestehende Asche nicht auf den Eisengehalt des Moleküls, sondern auf eine schwer zu entfernende Verunreinigung der Substanz mit Eisenverbindungen zurückzuführen ist. Vor allem die Tatsache, daß Meso-porphyrinogen[147]) keine Metallkomplexverbindung zu geben imstande ist, legt diesen Gedanken nahe; es ist aber wohl so, daß nur die Reduktion der Methingruppen zu Methylengruppen, wie sie durch Natriumamalgam bewirkt wird, die Farbigkeit, und damit auch die Fähigkeit zur Bildung von Metallkomplexverbindungen aufhebt. Es muß bei der „Perhydrohämin"-Bildung die Reduktion an ganz anderen Stellen des Moleküls angegriffen haben als bei der Mesoporphyrinogenbildung, denn trotz der Aufnahme von 10 Molen Wasserstoff hat das „Perhydrohämin" dieselbe intensive Färbung wie das Hämin und das Mesohämin. Daß das „Perhyrdrohämin" nicht etwa ein an sich ungefärbtes Produkt ist, das durch beigemischtes Mesohämin gefärbt erscheint, wird dadurch unwahrscheinlich gemacht, daß die Farbe in Lösungsmittel hineingeht, in denen Mesohämin völlig unlöslich ist[148]). Die Art des Absorptionsspektrums des „Perhydro-

[146]) Siehe auch W. J. Dilling, „Atlas der Hämochromogene" S. 34.
[147]) H. **84**, 262 (1913).
[148]) Natürlich ließe sich das auch so erklären, daß ein farbloses Reduktionsprodukt die Fähigkeit hat, Mesohämin in Lösungsmitteln, in denen es

hämins" beweist, daß das Eisen noch in komplexer Bindung vorliegt. Die „Hämine" und die „Porphyrine" haben ganz andere Typen von Absorptionsspektren; die Absorptionsspektren der „Hämine" haben im sichtbaren nur zwei Banden, während die Spektra der „Porphyrine" viel bandenreicher sind; so hat z. B. das Mesoporphyrin in Pyridin gelöst fünf Absorptionsstreifen; die Lage und Intensitätsverhältnisse derselben werden in der Tabelle an letzter Stelle wiedergegeben. Bei Austausch des Eisens im Mesohämin gegen Mangan tritt eine sehr erhebliche Änderung des Absorptionsspektrums ein; das zweibandige Spektrum geht in ein dreibandiges über, vielleicht infolge Verschiebung der ultravioletten Absorptionsbande des Hämins in den sichtbaren Teil des Spektrums. Außerdem kommt eine recht erhebliche kontinuierliche Absorption im violetten Teil des Spektrums hinzu, wodurch das Präparat, wenn es fein verteilt oder gelöst ist, wesentlich röter aussieht als das Mesohämin. Ähnlich liegen die Verhältnisse beim Kupfer-mesoporphyrin, das zwei Absorptionsbanden wie das Mesohämin hat (die Lage vor allem der langwelligeren Bande ist aber recht beträchtlich anders); durch Endabsorption im Violetten sieht aber auch das Kupfer-mesoporphyrin wesentlich röter aus als das Mesohämin und ähnelt so rein äußerlich dem Mangan-mesohämin weit mehr als dem Mesohämin.

VII. Kapitel.

Kristallographische Messungen.

Aus der nachfolgenden Tabelle der kristallographischen Auslöschungsschiefen[149]) der verschiedenen Blutfarbstoffderivate geht deutlich hervor, daß manche Änderung im Molekül, die auf das Absorptionsspektrum von Einfluß ist, die kristallographischen Verhältnisse nicht

---

an sich nicht löslich ist, löslich zu machen. (Ähnlich dem Choleinsäureprinzip von H. Wieland u. H. Sorge, H. **97**, 1, 1916, bei dem durch Desoxycholsäure wasserunlösliche Stoffe z. B. höhere Fettsäuren in wasserlösliche Molekülverbindungen umgewandelt werden.) Man ist aber ohne spezielle experimentelle Anhalte nicht berechtigt, auch in diesem Fall einen solchen Reaktionsmechanismus anzunehmen.

[149]) Unter Auslöschungsschiefe versteht man den Winkel, den die Richtung maximaler Dunkelheit, die man bei der Betrachtung des Kristalls zwischen gekreuzten Nicols beobachtet, mit der längsten Kante bildet; es wird dieser Winkel durch die optischen Eigenschaften des Kristalls bedingt. Bei so kleinen und so stark gefärbten Kristallen, wie es die der Blutfarbstoffderivate sind, ist eine tiefergehende optische Analyse (Angabe der Indikratixachsen) kaum möglich.

beeinflußt und umgekehrt. Die folgenden Angaben beziehen sich auf Messungen, die ich gemeinsam mit Herrn Professor Dr. Leonhard Weber im Mineralogischen Institut der Universität Fribourg (Schweiz) gemacht habe. Ich möchte auch an dieser Stelle Herrn Professor Weber für seine liebenswürdige Hilfe meinen besten Dank aussprechen. Die Beobachtungen erfolgten bei 600facher mikroskopischer Vergrößerung; die angeführten Zahlen sind Mittelwerte mehrerer Messungen; die Schwankungen und die möglichen Fehler betragen etwa 1—2°. Zahlen, neben denen ein St. steht, beziehen sich auf die Messungen von Professor Dr. Steinmetz, die ich einer Arbeit von H. Fischer und B. Pützer[150]) entnommen habe und die als Vergleich angeführt sind.

Substanz	Auslöschungsschiefe	Kantenwinkel	Bemerkungen
Chlorhämin	31—33°(31—36°St)	54—58°(St)	
Bromhämin	32°	—	
Jodhämin	33°	57°	
Rhodanhämin	40°	—	
Monomethylhämin	63° (27°, 36°)	—	Nicht einheitlich, da Kristalle verschiedener Auslöschungsschiefe.
Dihydrohämin	ungefähr gerade Anslöschung	—	Äußerst kleine Kristalle.
Mesohämin	33°	61°	
Manganmesohämin	42°	59°	Weniger langgestreckte Kristalle, Neigung zur Isometrie.

Sämtliche Kristalle zeigen starken Pleochroismus und Neigung zur Bildung langgestreckter Kristalle (letzteres mit Ausnahme des Manganmesohämins). In den Fällen, wo keine Kantenwinkel angegeben sind, waren die Kristalle an den Ecken stark gerundet. Das Dihydrohämin, dessen genaue kristallographische Untersuchung besonders interessant gewesen wäre — wegen evtl. Unterschiede dem Hämin und Mesohämin gegenüber —, ist leider so klein kristallisiert, daß diese nicht durchführbar ist. Es ist nicht ohne weiteres zulässig, die ungefähr gerade Auslöschung, die das Dihydrohämin zeigt, auf eine kristallographische Verschiedenheit gegenüber den anderen Präparaten zurückzuführen. Denn es ist sehr wohl möglich, daß es sich nur um eine Verschiedenartigkeit in der Ausbildung handelt. Wenn z. B. beim Dihydrohämin das Pinakoid besonders ausgebildet ist, das senkrecht auf dem beim Hämin ausgebildeten steht und gleichzeitig der Längsrichtung parallel geht,

---

[150]) H. **154**, 39 (1926).

so wäre die gerade Auslöschung ohne weiteres verständlich, wenn man annimmt, daß das Hämin dem monoklinen und nicht dem triklinen System, wie zumeist angegeben wird[151]), angehört. An so ungemein kleinen Kristallen sind aber alle kristallographischen Messungen nur äußerst schwierig durchzuführen.

Der Austausch des Chlors im Hämin gegen die andern Halogene bewirkt keine kristallographischen Veränderungen; Brom- und Jodhämin haben dieselbe Auslöschungsschiefe wie Chlorhämin; das Rhodanhämin, das sowohl in spektroskopischer Hinsicht, als auch in seiner Wirksamkeit als Katalase mit den Halogenhäminen übereinstimmt, weicht aber merkwürdigerweise in seiner Auslöschungsschiefe ganz beträchtlich von den Halogenhäminen ab. Vielleicht wird das dadurch bedingt, daß das Rhodanhämin fünf Stickstoffatome besitzt, während die Halogenhämine nur vier Stickstoffatome haben, trotzdem ja wohl äußerst wahrscheinlicherweise dem einen Stickstoffatom des Rhodanhämins eine Sonderstellung zukommt. Das Mesohämin hat dieselbe Auslöschungsschiefe wie das Hämin; die Reduzierung der Seitenketten, die sich spektroskopisch und in bezug auf die katalatische Wirksamkeit stark auswirkt, verändert die kristallographischen Eigenschaften nicht. Der Austausch des Eisens bewirkt ebenso wie bei den anderen Eigenschaften auch bei der Auslöschungsschiefe eine beträchtliche, außerhalb der Fehlergrenzen liegende Veränderung. In einem Präparat, das nach seiner Darstellung Mono-methyl-chlor-hämin[152]) sein sollte, fanden sich drei Arten von Kristallen, die sich deutlich durch ihre Auslöschungsschiefen voneinander unterscheiden; hierdurch wird eindeutig bewiesen, daß das Präparat uneinheitlich ist. Die Hauptmenge der Kristalle hatte eine wesentlich größere Auslöschungsschiefe als Hämin (vielleicht Mono-methyl-hämin); in kleinerer Anzahl waren Kristalle von einer geringeren Auslöschungsschiefe (vielleicht Dimethyl-hämin) und von ungefähr derselben Auslöschungsschiefe wie Hämin (vielleicht noch unverändertes Hämin) vorhanden.

Im vorhergehenden habe ich die Ergebnisse meiner Untersuchungen über Beziehungen zwischen chemischer Konstitution und verschiedenen physikalischen Eigenschaften der Blutfarbstoffderivate mitgeteilt. Es sollten dadurch womöglich Parallelen gefunden werden zu den Beziehungen zwischen chemischer Konstitution und katalytischer Wirksamkeit. Vorläufig genügen die experimentellen Erfahrungen noch nicht, um irgendwelche, all diese Erfahrungstatsachen verbindende Gesetz-

---

[151]) Siehe z. B. W. Küster im „Handbuch d. biochem. Arbeitsmethoden" Bd. 2, 621.

[152]) W. Küster, H. **109**, 122 (1920).

mäßigkeiten finden zu können. Es ist aber zu hoffen, daß die durch meine Versuche erzielte Vergrößerung des Erfahrungsmaterials dazu beiträgt, dem Ziel, eine derartige Gesetzmäßigkeit zu finden, näherzukommen.

VIII. Kapitel.

Die katalatischen und peroxydatischen Reaktionsbeschleunigungen.

A. Historische Übersicht.

Wie schon mehrfach erwähnt, habe ich vor allem die Beschleunigung zweier Reaktionen, nämlich die des katalatischen Hydroperoxydzerfalls gemäß der Gleichung $2H_2O_2 = 2H_2O + O_2$ und die der peroxydatischen Jodwasserstoffoxydation gemäß der Gleichung $2HJ + H_2O_2 = J_2 + 2H_2O$ durch verschiedene Blutfarbstoffderivate untersucht. Die Untersuchung der katalytischen Beschleunigung dieser beiden Reaktionen ist schon der Gegenstand ungemein zahlreicher Untersuchungen gewesen.

1. Die katalatische Hydroperoxydzersetzung.

Die Zersetzung des Hydroperoxyds durch anorganische Katalysatoren ist durch die Arbeiten von G. Bredig[153]) und seinen Schülern zu einem der bestuntersuchten Beispiele der Katalyse geworden. Es ist nicht möglich, an dieser Stelle auch nur auf die wichtigste Literatur über Hydroperoxydzersetzung durch anorganische Stoffe einerseits und durch Fermente andererseits einzugehen. Eine sehr gute Zusammenstellung der älteren Literatur über fermentative H_2O_2-Zersetzung findet sich bei F. Batelli und L. Stern: Die Katalase, Ergebnisse der Physiologie, Bd. 10, 531, 1910, während die neuere Literatur dieses Gebietes bei S. Morgulis: Die Katalase, Ergebnisse der Physiologie, Bd. 23, 308, 1924, nur ziemlich einseitig und unvollständig referiert ist. In der ersten Zeit enzym-chemischen Arbeitens ist angenommen worden, daß die Fähigkeit Hydroperoxyd zu zersetzen, allen Fermenten zukomme; diesen Irrtum richtig gestellt zu haben, ist vor allem das Verdienst von O. Loew[154]). Trotzdem herrscht in der Literatur, vor allem in der biologisch-medizinischen, ein heilloser Wirrwarr der Nomenklatur. Es werden oft die Begriffe „Katalyse", „Katalase" und

[153]) Zusammenfassende Darstellung Bio.Z. **6**, 283 (1907).
[154]) Z. B. B. **35**, 2487 (1902).

„Peroxydase“ auch heute noch verwechselt (vgl. auch Fußnote 15 auf S. 6). Daß das Blut Hydroperoxyd katalytisch zersetzt, wurde schon von dem Entdecker des Hydroperoxyds L. J. Thénard[155]) gefunden. Daß es sich aber dabei nicht um eine Eigenschaft des Blutfarbstoffs, sondern um die Wirkung eines im Blute enthaltenen Fermentes, der Hämase, handelt, hat zuerst G. Senter[156]) gefunden; durch die Arbeit von R. Willstätter und A. Madinaveitia[157]) ist dieser Befund dann völlig sichergestellt worden. Neuerdings ist er durch A. Kultjugin[158]) nochmals bestätigt worden. Im Gegensatz hierzu steht die Angabe von Hsien Wu[159]), daß nach seinen Versuchen auch Oxyhämoglobin katalatisch wirke, wenn auch der Hauptteil der katalatischen Wirkung des Blutes der Hämase zukomme. Ein Teil der Wuschen Versuche ist nicht beweiskräftig, da sie bei so starker Alkalität des Reaktionsmediums (n/5 NaOH) gemacht worden sind, daß unter diesen Bedingungen das Oxyhämoglobin in sehr weitgehendem Maße eine Spaltung in Globin und Hämatin erfährt; daß Hämatin katalatische Wirkungen hat, wird ja auch durch meine Versuche gezeigt. Wu selbst hat ebenfalls diese Bedenken gehabt und deshalb auch einige Versuche bei neutraler Reaktion gemacht; auch bei diesen Versuchen hat er eine, wenn auch sehr schwache katalatische Wirkung des Oxyhämoglobins gefunden. Bemerkenswert ist, daß nach Wus Angaben die katalatische Wirkung des HbO_2 bei neutraler Reaktion nicht nur im Vergleich zur katalatischen Wirkung von HbO_2 in alkalischem Medium, sondern auch im Vergleich zu der Wirkung von Hämatin bei neutraler Reaktion schwach ist (bei neutraler Reaktion hat HbO_2 ungefähr $^1/_4$ der Wirkung wie Hämatin, auf gleichen Eisengehalt bezogen). Worauf die Hydroperoxyd-zersetzung durch HbO_2 in den Wuschen Versuchen beruht, ist ohne ihre experimentelle Nachprüfung schwer zu sagen. Wu hat unter so ganz anderen Reaktionsbedingungen seine Untersuchungen durchgeführt als ich, daß ein direkter Vergleich kaum möglich ist, und da Wus Versuchsbedingungen sehr ungünstig und infolge der hohen H_2O_2-Konzentration die Schädigungen des Katalysators während der Reaktion nach seinen eigenen Angaben sehr große sind, so ist es wenig verlockend, seine Versuche nachzumachen. Immerhin läßt sich aus den Angaben H. Wus ersehen, daß unter Berücksichtigung des sehr kleinen Temperaturkoeffizienten der Katalasewirkung des Hämins und der

---

[155]) A. ch. (2) **9**, 441 (1818), **10**, 114, 335 (1819), **11**, 85 (1819.
[156]) Ph. Ch. **44**, 257 (1903).
[157]) Promotionsarbeit von A. Madinaveitia, Zur Kenntnis der Katalase, Zürich (1912).
[158]) Bio.Z. **167**, 238 (1926).
[159]) Journ. of Biochemistry, Tokio, **2**, 195 (1923).

komplizierten Kinetik der Reaktion seine Resultate mit den meinigen der Größenordnung nach übereinstimmen, wenigstens was das Hämin betrifft. Hätte das von mir untersuchte HbO_2 unter meinen Reaktionsbedingungen katalatische Wirksamkeit in annähernd ähnlichem Ausmaße, wie es nach Wu zu erwarten wäre, so hätte mir das unmöglich entgehen können. Es müssen also besondere Gründe vorliegen, wieso Wu eine Katalasewirkung des HbO_2 erhalten hat und ich nicht. Wu hat zur Bestimmung der Zersetzung des Hydroperoxyds die gasvolumetrische Methode, ich die permanganometrische Titration verwandt; da die gasvolumetrische Bestimmung infolge der Möglichkeit einer Übersättigung der Lösungen mit O_2 eher zu niedrige Werte als zu hohe liefert, so kann die Verschiedenheit der analytischen Methoden nicht der Grund dieser Differenz sein. Eine Möglichkeit, die Ergebnisse Wus zu erklären, ist, daß evtl. unter den von ihm angewandten Reaktionsbedingungen das HbO_2 Veränderungen erleidet, die es in einen katalatisch wirksamen Stoff umwandeln; dies könnte sowohl durch nicht genügende Pufferung — Wu verwandte „one drop of posphate mixture" — bedingt sein oder, was mir wahrscheinlicher erscheint, durch die sehr große Konzentration an Hydroperoxyd in Wus Versuchen. Bei den katalatischen Versuchen Wus fehlt zwar eine genaue Angabe über die Konzentration des Hydroperoxyds, das er verwandte, vollständig; in der vorhergehenden Arbeit[160]), in der er die peroxydatischen Eigenschaften von Blutfarbstoffderivaten untersucht, gibt er an, daß er „the commercial 3 per cent solution of hydrogen peroxide" benutzte; wenn er bei seinen katalatischen Versuchen ebenfalls 3%iges Hydroperoxyd verwendet, dann sind seine Reaktionsgemische 1,18 normal an Hydroperoxyd; das wäre eine 70 fach größere Hydroperoxyd-konzentration als bei meinen Versuchen; hinzu kommt, daß im käuflichen Hydroperoxyd oft Stabilisatoren enthalten sind, die evtl. auch auf das HbO_2 einwirken können (vgl. z. B. die Erfahrungen von R. Willstätter und A. Pollinger[161])). Möglich ist es auch, daß die katalatische Wirksamkeit von Wus HbO_2 dadurch bedingt ist, daß er die Abtrennung der Hämase nicht durch wiederholtes Umkristallisieren des Oxyhämoglobins bewirkt hat, was eine bewährte Methode zur Gewinnung ganz reiner HbO_2-Präparate ist, sondern durch mehrmaliges Schütteln mit Aluminium-Hydroxyd. Über den von ihm verwandten „Aluminia cream" macht er keine weiteren Angaben; die Konzentrationen wählte er so, daß die Gesamtlösung ca. 5% HbO_2 und 1% Aluminiumhydroxyd enthält. Um mich zu orientieren, ob man auf diese Weise HbO_2-Lösungen katalasefrei be-

---

[160]) Journ. of Biochemistry **2**, 190 (1923).
[161]) H. **130**, 281 (1923), und zwar S. 290 unten.

kommt, habe ich unter Verwendung des absorptionstüchtigen Aluminiumhydroxyds $C\gamma$, für dessen Überlassung ich Herrn Dr. H. Kraut zu Dank verpflichtet bin, und unter Einhaltung der von Wu angegebenen Konzentrationsbedingungen eine HbO_2-Lösung 5 Minuten lang mit Aluminiumhydroxyd geschüttelt, dann abfiltriert und nochmals 5 Minuten lang mit neuem Aluminiumhydroxyd geschüttelt. Selbst nach zweimaliger Behandlung war das HbO_2 noch katalatisch wirksam, und es ist daher sehr zweifelhaft, ob Wus Schluß, die Katalasewirkung käme dem HbO_2 selbst, und nicht etwa noch unabsorbierter Hämase zu, weil weitere Behandlung mit Aluminiumhydroxyd die katalatische Wirksamkeit unbeeinflußt lasse, stichhaltig ist, vor allem, wo aus Wus eigenen Zahlen zu ersehen ist, daß eine drei Mal mit Aluminiumhydroxyd geschüttelte HbO_2-Lösung nur 75% der Wirksamkeit von einer nur einmal so behandelter hat (berechnet auf gleichem HbO_2-Gehalt). Es ist vielleicht so, daß die Hauptmenge der Hämase (ca. 98%) gleich bei der ersten Behandlung mit Aluminiumoxyd absorbiert wird, während weitere Behandlungen mit Aluminiumhydroxyd das Verhältnis der HbO_2- und der Hämasemenge nur wenig verschiebt, was dann möglich ist, wenn eine grundlegende Änderung der Absorptionsverhältnisse der Hämase durch Entfernung einer Verunreinigung des Enzyms bei der ersten Absorption erfolgt ist. Zur exakten Beherrschung der Verhältnisse wäre es notwendig, die Freundlichschen Absorptions-Isothermen sowohl der Hämase wie des HbO_2 und die Abhängigkeit derselben von Fremdstoffen zu kennen.

Ich glaube, durch die vorhergehenden Ausführungen gezeigt zu haben, daß die übereinstimmende Angabe von G. Senter, von R. Willstätter und A. Madinaveitia und von A. Kultjugin, daß reines HbO_2 nicht katalatisch wirke, mehr Glauben verdient als die entgegengesetzte von H. Wu, gegen dessen Experimente sich so gewichtige Einwände erheben lassen. Ich selbst habe bei dreimal umkristallisiertem HbO_2 zwischen pH 5 und pH 8 auch nicht mehr die geringste Spur von Katalasewirkung nachweisen können (nach einer Stunde war im HbO_2-Versuch (ca. 10 mg) unter Abzug des Eigenverbrauchs des HbO_2 der Verbrauch an n/10 $KMnO_4$ um 0,02 ccm größer als im Leerversuch), und ich kann somit die erstgenannten Autoren vollauf bestätigen. Es soll aber nicht verschwiegen werden, daß es bei einem anderen Blutfarbstoffpräparat[162]) trotz viermaligem, sehr sorgfältigem Umkristallisieren nicht gelang, ein nicht katalatisch

[162]) Ich habe immer Pferdeblut zur Darstellung des HbO_2 verwandt, und zwar deshalb, weil es von den leichter zugänglichen Blutarten am besten zur Kristallisation zu bringen ist.

wirkendes Präparat zu bekommen. Zwar bin ich nicht in der Lage zu entscheiden, worauf dies zurückzuführen ist, doch würden alle drei folgenden Annahmen eine Erklärungsmöglichkeit bieten:

1. Dem Präparat war irgendeine schwer abtrennbare Verunreinigung (evtl. ein Zersetzungsprodukt des HbO_2), die katalatisch wirkt, beigemengt.

2. Bei manchen Tieren ist HbO_2 und Hämase auch durch wiederholtes Umkristallisieren des HbO_2 nicht quantitativ trennbar.

3. Dem HbO_2 mancher Tiere kommt katalatische Wirksamkeit zu.

Nur eine Untersuchung recht zahlreicher Kristallisationen von HbO_2 verschiedener Herkunft könnte die Frage, welche der vorgenannten Möglichkeiten die richtige ist, der Entscheidung näherbringen. Ich halte die dritte Möglichkeit für am unwahrscheinlichsten, die erste für am wahrscheinlichsten. Eine Beobachtung, die für die erste Annahme spricht, ist, daß das in Frage stehende Präparat zwar völlig methämoglobinfrei war, aber ein merkwürdig dunkles Rot zeigte.

Weit weniger als die katalytischen Eigenschaften des HbO_2 sind die des Hämins untersucht. Die katalatische Wirksamkeit des Hämins war von H. Wu[163]) beschrieben worden; seine Angabe fand aber wohl wegen der Schwerzugänglichkeit der Literaturstelle und wegen seiner vielen Widersprüche zu anderen Autoren keine Beachtung. Daß Hämin unter den verschiedensten Bedingungen katalatisch wirksam ist, wird durch meine Beobachtungen völlig sichergestellt, und mit der Erforschung der Abhängigkeit der katalatischen Wirksamkeit des Hämins von den Reaktionsbedingungen beschäftigt sich ein großer Teil der folgenden Versuche. Über die katalatische Wirksamkeit anderer Blutfarbstoffderivate war noch nichts bekannt, außer der Angabe von H. Wu, daß Hämatoporphyrin im Gegensatz zu den noch eisenhaltigen Abbauprodukten des Blutfarbstoffs nicht mehr katalatisch wirkt, was ich in vollem Umfang bestätigen kann.

2. Die peroxydatische Jodwasserstoffzersetzung.

Auch über die katalytische Beschleunigung der Oxydation von Jodwasserstoff durch Hydroperoxyd ist schon vielfach gearbeitet worden. Über die Kinetik der unkatalysierten Reaktion $H_2O_2 + 2HJ = 2H_2O + J_2$ hat vor allem A. A. Noyes[164]) gearbeitet; ich kann seinen Schlußfolgerungen über die Reaktionsordnung vollauf zustimmen. Für die Annahme, es handelt sich bei der sogenannten Leer-

[163]) Journ. of Biochemistry **2**, 195 (1923). Die erste, nur qualitative Angabe über die katalatische Wirksamkeit des Hämins findet sich bei C. Salkowski, Bio.Z. **32**, 345 (1911).

[164]) Ph. Ch. **18**, 131 (1895).

reaktion — d. h. bei Ablauf der Reaktion ohne zugesetzten Katalysator — um eine, durch geringfügige Verunreinigungen katalytisch beschleunigte Reaktion, liegen keine experimentellen Anhaltspunkte vor. Geringe Eisenmengen würden wohl auf die Reaktion beschleunigend einwirken, aber wenn es sich dabei um Eisen-(II-)Ionen handeln würde, so würde die Reaktion sehr bald zum Stillstand kommen, nämlich wenn alle Ferro-Ionen in Ferri-Ionen umgewandelt sind[165]). Den meisten komplexen Eisenverbindungen kommt eine katalytische Wirksamkeit bei dieser Reaktion nicht zu, und so scheint es wenig wahrscheinlich, daß es sich bei der mit ziemlich konstanter Geschwindigkeit verlaufenden Leerreaktion um eine Katalyse durch kleinste Eisenmengen handelt. Eine Autokatalyse durch das sich bei der Reaktion bildende Jod, wie sie sowohl von O. Warburg[166]) als auch von F. G. Fischer und C. Wagner[167]) für die Oxalsäure-oxydation durch Jodsäure nachgewiesen worden ist, kommt für die Jodwasserstoff-oxydation durch Hydroperoxyd nicht in Betracht, da die Reaktionsgeschwindigkeit die gleiche bleibt, ob man das sich bildende Jod fortlaufend titriert oder nicht. Der Einfluß der Wasserstoff-Ionen-Konzentration auf die Leerreaktion ist ein recht komplizierter, später noch zu erörternder; es ist aber nach der pH-Kurve der Leereaktion nicht wahrscheinlich, daß es sich in diesem Fall um eine Wasserstoff-Ionen-Katalyse handelt. Man kann also nicht ohne weiteres für die Leerreaktion irgendeinen, in kleiner Menge anwesenden Katalysator verantwortlich machen.

Durch die Arbeit von J. Brode[168]) sind nämlich eine erhebliche Zahl von anorganischen Katalysatoren der peroxydatischen Jodwasserstoffoxydation bekannt geworden; Brode hat auch schon die Nicht-Additivität bei Verwendung eines Gemisches von mehreren Katalysatoren beobachtet, eine Erscheinung, die später von amerikanischen Autoren weiter untersucht worden ist und zur Aufstellung des Begriffes „promotor action" geführt hat. Auch der Einfluß von HbO_2 auf die Reaktionsgeschwindigkeit der Jodwasserstoff-oxydation durch Hydroperoxyd ist schon untersucht worden, wenn auch zur Untersuchung der peroxydatischen Eigenschaften des HbO_2 ebenso wie bei den echten Peroxydasen hauptsächlich die Oxydation organischer Verbindungen (Polyphenole, aromatische Diamine oder Leukoverbindungen von Farbstoffen) herangezogen worden sind. Man hat dies getan, teils wegen der Bequemlichkeit der in diesem Fall anwendbaren kolorimetrischen

---

[165]) Über Widersprüche bezüglich der katalytischen Wirksamkeit von Eisen-(II)Ionen bei der in Frage stehenden Reaktion sei auf S. 113 verwiesen.
[166]) Bio.Z. **174**, 497 (1926).
[167]) B. **59**, 2384 (1926).
[168]) Ph. Ch. **37**, 257 (1901).

Bestimmungsmethoden, teils um die Jodschädigung des Oxyhämoglobins bzw. der Enzyme zu vermeiden. Es läßt sich der zuletzt angeführte Mißstand aber ausschalten, wenn man nach dem Vorbild von J. Wolff und E. de Stoecklin[169]) arbeitet, die angeben „L'iode mis en liberté au fur et à mesure" stets wegtitriert zu haben; man verhindert so, daß im Reaktionsgemisch jemals eine nennenswerte Jod-konzentration entsteht. Es wird bei dieser Arbeitsweise die jodometrische Bestimmung der peroxydatischen Wirksamkeit eines Katalysators allen anderen Methoden überlegen, einerseits wegen der leichten Erreichbarkeit einer großen Genauigkeit bei der jodometrischen Titration, andererseits, weil man durch jeden Versuchsansatz leicht eine ganze Kinetik (unter den gegebenen Bedingungen) erhält. Daß auch nach Einhalten dieser Vorsichtsmaßregel bei längerer Reaktionsdauer die peroxydatische Wirksamkeit des HbO_2 stark nachläßt, beruht auf der Empfindlichkeit des HbO_2 gegen Hydroperoxyd, die auch schon von J. Wolff und E. de Stoecklin[170]) beobachtet worden ist. Wenn ich auch auf die riesige Literatur über peroxydatische Reaktionen[171]) hier ebensowenig eingehen kann wie vorher auf die über katalatische Wirkungen, vor allem, da ja das Gebiet durch die Tatsache, daß sowohl eine Variation des Sauerstoffdonators als auch eine des Sauerstoffakzeptators[172]) möglich ist, nahezu unübersehbar groß ist, so will ich doch nicht versäumen, zu betonen, daß Erkenntnisse, die bei der Untersuchung der peroxydatischen Beschleunigung irgendeiner Reaktion gewonnen worden sind, sich nicht ohne weiteres auch auf andere peroxydatisch beschleunigte Reaktionen übertragen lassen. Dies ist in neuerer Zeit vor allem auch von H. Ucko und H. W. Bansi[173]), die die pH-Abhängigkeit der Wirksamkeit pflanzlicher Peroxydasen bei der Beschleunigung der Oxydation verschiedener organischer Substrate untersucht haben, betont worden; sie schreiben: „Das pH-Optimum ist also nicht vom Enzym abhängig, sondern von der jeweiligen enzymatischen Reaktion." So sind die Untersuchungen anderer Autoren über die peroxydatischen Wirkungen des Blutfarbstoffs nicht ohne weiteres mit meinen Ergebnissen vergleichbar. Dies gilt vor allem auch für die Arbeit von R. Willstätter und A. Pollinger[174]), die den Einfluß des HbO_2 auf die Oxydation

---

[169]) C. r. **146**, 1415 (1908).
[170]) C. r. **151**, 483 (1910).
[171]) Eine die Literatur bis 1912 umfassende Literaturzusammenstellung findet sich bei E. Batelli u. L. Stern, Ergebn. d. Physiologie **12**, 96 (1913).
[172]) In der Sprache der Dehydrierungstheorie ist „Sauerstoffdonator = „Wasserstoffakzeptor" und „Sauerstoffakzeptor = „Wasserstoffdonator".
[173]) H. **164**, 57 (1927).
[174]) H. **130**, 281 (1923).

des Pyrogallols durch Hydroperoxyd zu Purpurogallin untersuchten. Als ich einige orientierende Versuche mit der Willstätterschen Methode machte, fand ich, daß das pH der Reaktionslösung nicht nur auf die Menge des gebildeten Farbstoffes, sondern auch auf den Farbton von Einfluß ist, was das Kolorimetrieren sehr erschwert. Ich habe deswegen nur einige wenige Versuche mit der Purpurogallin-Methode gemacht und bin nicht in der Lage zu entscheiden, ob die Ergebnisse der Arbeit von R. Willstätter und A. Pollinger auch bei Berücksichtigung des Einflusses des pH noch zutreffend sind oder nicht. Von älteren Arbeiten über die peroxydatischen Wirkungen des HbO_2, die natürlich alle so wie die Willstättersche Arbeit noch ohne Berücksichtigung des pH gemacht worden sind, sind für mich vor allem die von E. v. Czyhlarz und O. v. Fürth[175]) und die von J. Wolff und E. de Stoecklin[176]) wichtig, da in diesen beiden Arbeiten ebenso wie in der meinigen die Beschleunigung, die das HbO_2 auf die peroxydatische Jodwasserstoff-oxydation mit Hydroperoxyd ausübt, untersucht worden ist. Czyhlarz und Fürth schreiben: „Dagegen fanden wir in der Jodwasserstoffsäure ein empfindliches Peroxydasenreagenz, das mit Hämoglobin und Hämatin nicht reagiert." Diese Angabe ist irreführend. Czyhlarz und Fürth haben in verdünnt essigsaurer Lösung gearbeitet; bei diesem niedrigen pH ist pflanzliche Peroxydase noch wirksam, während HbO_2 und Hämin schon ihre Wirksamkeit eingebüßt haben[177]). Bei höherem pH sind aber auch HbO_2 und Hämin befähigt, die Jodwasserstoffoxydation zu beschleunigen, so daß Czyhlarz und Fürths Behauptung, außer für ganz bestimmte Reaktionsbedingungen, nicht richtig ist. Im Gegensatz zu diesen beiden Autoren haben J. Wolff und E. de Stoecklin die Verhältnisse richtig erkannt; sie geben an, daß HbO_2 nur unter Ausschluß freier Säuren die Jodwasserstoffoxydation zu beschleunigen imstande ist, und daß das günstigste Reaktionsmilieu durch Zugabe von Monophosphat oder Dizitrat entstände, was sich völlig mit meinen Erfahrungen deckt, daß HbO_2 bei ungefähr pH 5 sein Wirkungsmaximum hat. Es ist erstaunlich, wie umsichtig in der Arbeit von Wolff und Stoecklin auch ohne Kenntnis der Arbeit von S. P. L. Sörensen[178]) über den Einfluß der Wasserstoff-ionen-konzentration auf enzymatische Vorgänge der Einfluß des pH berücksichtigt ist.

Während von den früheren Autoren meist nicht die peroxydatischen und katalatischen Eigenschaften der prosthetischen Gruppe des Blut-

[175]) Hofmeisters Beiträge **10**, 358 (1907).
[176]) C. r. **151**, 483 (1910) und Ann. de l'Institut Pasteur, novembre 1909.
[177]) Siehe darüber später ausführlicher.
[178]) Bio.Z. **21**, 131 (1909).

farbstoffs untersucht worden sind, sondern die des genuinen Blutfarbstoffs selbst, habe ich vor allem die katalytischen Eigenschaften des Hämins und erst in zweiter Linie die des Oxyhämoglobins untersucht. Der Grund hierfür ist, daß das Oxyhämoglobin ein sehr empfindlicher Körper ist, der in hohem Maße Alterungserscheinungen zeigt. Außerdem sind Präparate verschiedener Herkunft und Darstellung nie völlig identisch, und so ist es schwer, eine größere Versuchsreihe mit einem derartigen Material durchzuführen, vor allem, da die Zulässigkeit von den in einem solchen Fall unbedingt notwendigen Extrapolationen äußerst fraglich ist. Aus diesem Grund habe ich die meisten Fragen über den Einfluß der Reaktionsbedingungen auf die katalytischen und peroxydatischen Reaktionen am Hämin untersucht. Hämin ist eine gut kristallisierende, einwägbare Substanz, deren Lösungen unbeschränkt lange haltbar sind[179]). Wenn ich eine Versuchsreihe mit HbO_2 angesetzt habe, so habe ich mich bemüht, sie in möglichst kurzer Zeit (höchstens 24 Stunden) durchzuführen, um so die Alterungserscheinungen tunlichst auszuschalten.

B. Besprechung der Versuchsergebnisse.

Um die Übersichtlichkeit bei der Darstellung meiner Untersuchungen über die Abhängigkeit der katalytischen Wirksamkeit der Blutfarbstoffderivate nicht allzusehr herabzusetzen, habe ich die eigentlichen Meßresultate am Schluß der Arbeit in Tabellenform zusammengestellt. Die Besprechung der aus den Meßresultaten zu ziehenden Schlüsse wird an Hand des beigegebenen Kurvenmaterials erfolgen; die Nummern der dazugehörigen Tabellen sind jeweils am Rand vermerkt. Die rein analytischen Angaben, ebenso wie die elektrometrischen pH-Bestimmungen und die pCl-Messungen, sind gleichfalls an den Schluß der Arbeit gestellt worden. Das Gliederungsprinzip des sich mit den katalytischen Wirkungen beschäftigenden Teils der Arbeit ist folgendes:

Im ersten Teil werden sämtliche Erfahrungen über die katalytischen Wirkungen des Hämins mitgeteilt, und zwar werden zuerst die katalatischen Fähigkeiten des Hämins, danach die peroxydatischen Fähigkeiten desselben abgehandelt; als Sonderkapitel fungieren die Untersuchungen über die peroxydatische Leerreaktion, über die katalatische Wirkung des Jod-ions und über den gleichzeitigen Ablauf der katalatischen und peroxydatischen Reaktion. Bei jedem einzelnen Kapitel sind Unterteilungen erfolgt, worin jeweils die Abhängigkeit von je

[179]) Über gewisse Alterungserscheinungen, vor allem in der ersten Zeit nach dem Auflösen, siehe später, S. 71.

einer Variablen untersucht wird; auch den Schädigungen des Hämins ist ein eigenes Unterkapitel gewidmet; einen besonders breiten Raum nimmt die Untersuchung des Einflusses von Pyridin auf die katalatische und peroxydatische Wirksamkeit des Hämins ein.

Im zweiten Teil werden dann die andern untersuchten Katalysatoren abgehandelt, und zwar sowohl die in den Kreis der Untersuchung gezogenen Blutstoffderivate als auch die synthetisch dargestellten komplexen Eisenverbindungen und das Ferro-Ion.

Zum Schluß kommen die Beobachtungen, die bei der Variation eines der Reaktionsteilnehmer an der peroxydatischen Reaktion gemacht worden sind, und dann eine nochmalige Zusammenstellung der wichtigsten Ergebnisse, die einen quantitativen Vergleich der Wirksamkeit der verschiedenen untersuchten Katalysatoren erlaubt.

1. Die katalatischen Wirkungen des „Na_2HPO_4-hämins".

Die Versuchsbedingungen, unter denen weitaus die meisten Kataläseversuche gemacht worden sind, sind folgende:

20 ccm 0,17 n H_2O_2 + 20 ccm $\frac{m}{5}$ Phosphatgemische[180]) wurden zu 197 ccm aufgefüllt und in einem großen Bottich schmelzenden Eises auf 0° abgekühlt; die Temperaturschwankungen waren ohne irgendwelche besonderen Vorsichtsmaßregeln kleiner als $\pm$ ½°. Das Hydroperoxyd wurde jeden Tag erneut mit $\frac{n}{10}$ $KMnO_4$[181]) eingestellt. Hatte der Titer um mehr als 1% abgenommen, so wurde er durch Zusatz einiger Tropfen Perhydrol auf den alten Titer gebracht. Das verwandte Perhydrol war das völlig zusatzfreie Präparat von C. Merck in Paraffinflaschen (nicht die Tropensorte!). Die verdünnte Hydroperoxydlösung wurde meist gleich in größerer Quantität (5 Liter) hergestellt und in einer großen braunen Flasche, die innen mit einer dünnen Paraffinschicht überzogen war[182]), aufgehoben. Unter diesen Bedingungen ist die Selbstzersetzung des Hydroperoxyds eine sehr langsame. Von Zeit

[180]) Es wurden die bei C. A. F. Kahlbaum käuflichen, nach S. P. L. Sörensens Vorschlag dargestellten Phosphate, KH_2PO_4 und Na_2HPO_4, $2H_2O$ verwandt, und die Lösungen, um Zersetzung durch Bakterien zu vermeiden, mit Toluol geschüttelt und überschichtet.

[181]) Der $KMnO_4$-Titer wurde von Zeit zu Zeit mit Natriumoxalat eingestellt, aber zumeist unverändert gefunden.

[182]) Eine andere, bequemere Methode, um die Selbstzersetzung des Hydroperoxyds zu verzögern, ist der Zusatz von 1 ccm 30%iger Phosphorsäure zu den 5 Litern 0,17 n Hydroperoxyd. Die hierdurch verursachte Verschiebung des pH im Versuchsansatz ist so gering, daß sie ohne Bedeutung ist.

zu Zeit muß die Flasche neu paraffiniert werden, da infolge der unvermeidlichen Temperaturschwankungen nach einiger Zeit der Paraffinüberzug abblättert. Den Berechnungen wurde nicht der Soll-Titer von 0,17 n zugrunde gelegt, sondern der jeweils gefundene Titer. Die Fehler, die durch die Schwankungen des Titers (die zersetzte H_2O_2-Menge ist ja auch eine Funktion der zugegebenen Menge H_2O_2) entstanden, waren so gering, daß sie angesichts der sonstigen recht erheblichen Fehlerquellen vernachlässigt werden konnten, betrugen ja die Schwankungen im Hydroperoxyd-Titer nur $\pm$ 1%. Zu der abgekühlten Lösung wurden zu einer mit der Stoppuhr genau festgelegten Zeit 3 ccm einer 0,1%igen Häminlösung[183]) zugegeben (damit wurde das Reaktionsvolumen 200 ccm; die Katalysatorkonzentration im Reaktionsgemisch ist dann 0,023 Millimol im Liter). Das Hämin war nach der M. Schalfejeffschen[184]) Methode durch Einfließenlassen von Blut in 100° heißen, mit NaCl gesättigten Eisessig dargestellt worden. Das so gewonnene Hämin war analysenrein; es löste sich in Chloroform-Pyridingemischen ohne Rückstand, die sogenannte „carcasse"[185]) auf; die katalytische Wirksamkeit des primären Produktes ist dieselbe wie die des nach W. Küster[186]) aus Pyridin-Chloroformgemischen bzw. aus Chinin-Chloroformlösung umkristallisierten. Die verwandte Katalysatorlösung war durch Auflösen des analysenreinen, im Trockenschrank bei 110° getrockneten, abgewogenen Hämins in sec. Phosphat dargestellt worden, wozu ein längeres Erhitzen bis zum Sieden der Flüssigkeit notwendig ist. Die so dargestellte Lösung enthielt 1 g Hämin im Liter und war $\frac{m}{50}$ an Na_2HPO_4 und $\frac{m}{650}$ an Hämin. Nach einer auf der Stoppuhr genau abgelesenen Zeit wurde mit verdünnter Schwefelsäure angesäuert, und das noch vorhandene Hydroperoxyd mit $\frac{n}{10}$ $KMnO_4$ titriert; hierbei muß natürlich der Eigenverbrauch des Hämins an Permanganat berücksichtigt werden; er wurde in einem besonderen Versuch festgestellt; 3 ccm $\frac{m}{650}$ Häminlösung verbrauchen

---

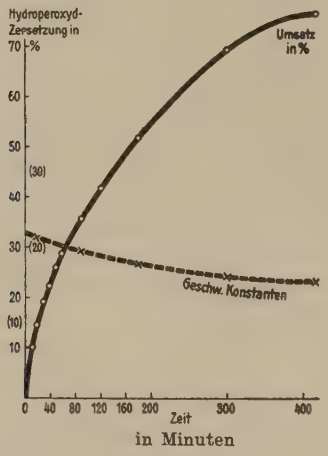
[183]) Ein Vorkühlen der Häminlösung war nicht nötig, denn die durch die Häminlösung bedingte Temperaturerhöhung des Reaktionsgemisches betrug höchstens $^1/_3{}^0$, und da das schmelzende Eis infolge Verunreinigungen meist ein klein wenig kälter als 0° war, so wurde dadurch die vorhandene Abweichung ungefähr kompensiert.

[184]) B. **18c**, 232 (1885) bzw. nach der Modifikation derselben von M. Nencki u. J. Zaleski, H. **30**, 390 (1900).

[185]) Siehe M. Nencki u. J. Zaleski, H. **30**, 389 (1900/01).

[186]) H. **40**, 394 (1904).

1,62 — 1,65 ccm $\frac{n}{10}$ $KMnO_4$. Von allen Versuchsfehlern sind aber zweifelsohne die der Titration die größten. Das beruht darauf, daß aus dem Hämin durch das Permanganat farblose Oxydationsprodukte entstehen, die aber immer noch, wenn auch langsamer, auf das Permanganat entfärbend wirken, so ist der Umschlagspunkt nicht ganz scharf zu erkennen; die dadurch bedingten Fehler können bis zu 0,5 ccm ausmachen, und lassen sich auch bei großer Übung nicht unter 0,3 ccm herunterdrücken. Ich habe immer, um möglichst gleichartige Resultate zu bekommen, so lange $KMnO_4$ zugegeben, bis ein kräftiger rosa Farbton



Figur 1.
Kinetik der Katalasewirkung des „Na_2HPO_4-hämins".

ca. ½ Minute bestehen blieb. Zumeist habe ich, wie eben beschrieben, den ganzen Ansatz auf einmal titriert, vereinzelt habe ich es aber auch so gemacht, daß ich zu gegebenen Zeiten aus dem Versuchsansatz, der dann meist ein Vielfaches des oben beschriebenen Grundansatzes war, einen aliquoten Teil herauspipettiert und dann nach dem Einfließenlassen in verdünnte Schwefelsäure mit $\frac{n}{10}$ $KMnO_4$ titriert habe. Diese Methode hat den Vorteil, daß man gleich durch einen Versuchsansatz eine ganze Kinetik bekommt, aber den großen Nachteil, daß es infolge des mit dem Puffergemisch in die Reaktionslösung hineingekommenen

Toluols nicht möglich ist, genau zu pipettieren, da die Pipette nicht ordentlich abläuft.

Vorstehende Figur 1 gibt die Kinetik der Katalasewirkung des Hämins bei pH 7,93 wieder. Der Versuch ist nach der an zweiter Stelle angeführten Methode durchgeführt. Der Gesamtansatz betrug das fünffache des Grundansatzes, die jeweils zu den angegebenen Zeiten herauspipettierte Menge 50 ccm. Die Hauptkurve gibt den Umsatz in Prozenten der Anfangsmenge Hydroperoxyd, die gestrichelte Kurve den Abfall der Reaktionskonstante erster Ordnung[187]) wieder. Die Konstanten sind unter Außerachtlassung des ersten Zeitintervalls ausgerechnet, da in diesem die Geschwindigkeit mehr als doppelt so groß wie während der übrigen Zeit ist[188]) (in der Tabelle, nicht aber in der Kurve, ist der Wert, den k in den ersten 10 Minuten hat, eingetragen), aber auch dann noch sinkt k im Verlauf von 6 Stunden um mehr als 20%. Aus andern Versuchen ist zu schließen, daß dies nicht etwa durch eine Abweichung vom monomolekularen Reaktionsverlauf zu erklären ist, sondern auf einer Schädigung des Katalysators beruht, die z. B. in einer Stunde ca. 13% beträgt. Zu erwähnen ist noch, daß bei den Katalaseversuchen ein Wert für den Leerversuch — d. h. für die Abnahme des H_2O_2-Titers in Abwesenheit eines Katalysators der Zersetzung — nicht in Abzug zu bringen ist, da unter meinen Versuchsbedingungen selbst in den alkalischsten Versuchen bei pH8 der Titer des H_2O_2 während einer Stunde völlig unverändert bleibt, wenn man die Ungenauigkeit des Titrierens, die ungefähr $\pm$ 0,1 ccm beträgt, berücksichtigt; dieser Befund stimmt mit den Angaben von G. Phragmen[189]), daß die Selbstzersetzung des H_2O_2 erst bei einem pH größer als 8,6 meßbar wird, überein.

Siehe Tab. 1 (S. 129)

Die Abhängigkeit der Katalasewirkung des Hämins vom pH wird durch Kurvenzug 1[189a]) der Figur 2 veranschaulicht; die Kurvenzüge geben hier und in allen Fällen der Katalasebestimmung, wo nichts besonderes angegeben ist, die unter den obengeschilderten Normalbedingungen gewonnenen Stundenwerte des Minderverbrauchs an $\frac{n}{10}$ $KMnO_4$ in ccm wieder. Bei gealterten Häminlösungen ist zwischen pH 8

Siehe Tab. 2

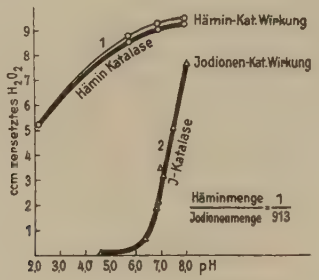
[187]) Die Formel zur Konstantenausrechnung siehe bei der dazugehörigen Tabelle, die Zeichnungsmaßstäbe bei den Figuren selbst.

[188]) Ob das auf eine besonders große Katalysatorschädigung im ersten Reaktionsintervall oder auf einen sogenannten Oxydationsstoß zurückzuführen ist, bleibe dahingestellt.

[189]) C. 1921, III, 86.

[189a]) Es sind zur Demonstrierung der Geringfügigkeit der Abweichungen der Meßresultate untereinander beide Kurvenzüge, die sich auf zwei völlig unabhängige Versuchsreihen beziehen, eingezeichnet.

und pH 5 nur eine geringfügige Abnahme der Wirkung mit steigender Acidität zu beobachten und selbst in so stark saurem Milieu, wie pH 2, wo das Hämin in verhältnismäßig kurzer Zeit ausflockt, ist noch über 50% der Wirksamkeit vorhanden.



Figur 2.
„Na_2HPO_4-hämin"- und Jod-ion-Katalasewirkung.

Eine von mir erst ziemlich spät gemachte Erfahrung ist, daß die Art der pH-Abhängigkeit von dem Alter der Häminlösung beeinflußt wird. Ich habe bei meinen ersten Versuchen über die katalatische Wirkung des Hämins mit einer ungefähr 1½ Jahre alten Häminlösung gearbeitet und bei diesen Versuchen die eben beschriebene weitgehende Unabhängigkeit der katalatischen Wirksamkeit vom pH gefunden. Als ich später meine Resultate mit einer frisch dargestellten Häminlösung überprüfte, bekam ich dieselben Werte bei den Versuchen zwischen pH 6
Siehe Tab. 3 und pH 8, während der Versuch bei pH 5,72 einen um 40% zu niedrigen Wert gab. Eine vielmalige Wiederholung des Versuchs bestätigte diese Tatsache; es handelte sich also nicht um ein zufälliges Resultat, sondern um eine Verschiedenheit in den Eigenschaften von einer frischen und einer gealterten Lösung von Hämin. Es ist zu erwähnen, daß die frisch bereitete Lösung nach viermonatlichem Stehen gegenüber der sehr lange gealterten Lösung auch bei niedrigem pH (5,72) nur noch eine um 8% geringere Wirksamkeit aufweist, also schon der stark gealterten Lösung näher steht, als der frischen. Um zu ergründen, worauf die Verschiedenheit zwischen frischer und gealterter Häminlösung beruht, habe ich folgende Versuche unternommen:

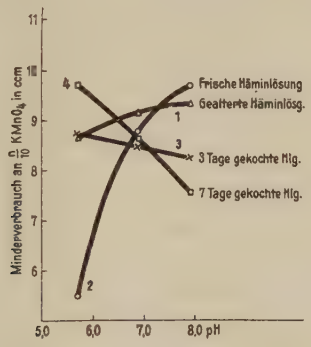
Ich habe größere Proben einer frisch bereiteten Häminlösung 3 bzw. 7 Tage am Rückflußkühler gekocht und dann auf ihre katalatische Wirksamkeit untersucht, von der Erwägung ausgehend, daß der die

Alterung bewirkende Prozeß bei höherer Temperatur wahrscheinlich schneller verläuft.

In Figur 3 ist durch Kurvenzug 1 die pH-Abhängigkeit der Katalasewirkung bei Verwendung gealterter Häminlösung, durch Kurvenzug 2 diejenige bei Verwendung einer frisch bereiteten Häminlösung wiedergegeben. Kurvenzug 3 zeigt die Veränderung der pH-Abhängigkeit einer frisch bereiteten Häminlösung durch 3 tägiges, Kurvenzug 4 die durch 7 tägiges Kochen. Man sieht, daß die Werte des Kurvenzuges 3 von denen des Kurvenzuges 1 nicht allzusehr abweichen, und eine Über-

Siehe Tab. 4

Siehe Tab. 4a



Figur 3.
Einfluß der Vorbehandlung auf die Katalasewirkung des „Na_2HPO_4-hämins".

schlagsrechnung zeigt, daß, wenn der Alterungsprozeß pro 10° Temperaturerhöhung eine Geschwindigkeitsverdoppelung erfährt, 3 tägiges Kochen (100°) etwa zweijährigem Stehen bei Zimmertemperatur (ca. 20°) äquivalent ist. Schon bei der Besprechung der Probleme der Konstitution des Hämins[190]) habe ich erwähnt, daß nach meiner Meinung der Alterungsprozeß auf einen Austausch des Chlors gegen Hydroxyl beruht, und daß die Zunahme der elektrometrisch gemessenen Chlor-ionen-konzentration bei gealterten Häminlösungen um ca. 50% hiermit in vollem Einklang steht[191]). Für die merkwürdige Tatsache, daß 7 Tage gekochte Häminlösungen im sauren Gebiet wesentlich wirksamer sind als im alkalischen, weiß ich keine Erklärung. Bei dem sich aber wohl primär aus dem Hämin[192]) bildenden Hämatin liegen sowohl Isomeri-

[190]) Siehe S. 41.
[191]) Siehe auch später bei den elektrometrischen Messungen, S. 150.
[192]) Siehe auch die gleiche Wirksamkeit aller Halogen-Hämine, S. 108.

sierungs-, als auch Polymerisierungsmöglichkeiten vor, so daß damit zu rechnen ist, daß das Hämatin bei so langem Kochen noch weitere Veränderungen erleidet.

Ich will an dieser Stelle die Wiedergabe einiger Beobachtungen über die H_2O_2-Zersetzung durch Jod-ion einschalten. Diese Reaktion ist von E. Schöne[193]) entdeckt und dann hauptsächlich durch J. Walton[194]), E. Abel[195]) und H. S. Harned[196]) untersucht worden. Der Grund, weswegen ich mich auch mit dieser Reaktion beschäftigt habe, ist der, daß ich bei den Untersuchungen über die peroxydatischen Wirkungen des Hämins Jodkalium als Substrat verwandt habe; da die dann im Reaktionsgemisch enthaltenen Jod-ionen katalatisch wirken, so wird also die H_2O_2-Konzentration nicht nur durch die Hämin-Katalase- und -Peroxydase-Wirkung und durch die Leerreaktion der Jodwasserstoffoxydation vermindert, sondern auch durch die Jod-ion-katalase, deren Ausmaß man also bei der Beurteilung der Gesamtvorgänge kennen muß. Es hat sich herausgestellt, daß diese Reaktion, deren Untersuchung so erfolgte, daß 20 ccm 0,175 n H_2O_2- + 20 ccm $\frac{m}{5}$ Phosphatpuffer auf 190 ccm verdünnt und nach Abkühlung auf 0° mit 10 ccm 0,42 n KJ versetzt wurde, und das nach einer Stunde noch vorhandene Hydroperoxyd unter MoO_3 Zusatz jodometrisch titriert wurde[197]), im höchsten Maß pH-abhängig ist, und erst bei geringerer Acidität als pH 6 von meßbarer Größe wird. Die pH-Abhängigkeit wird durch den Kurvenzug 2 der Figur 2 (S. 70) wiedergegeben. Wahrscheinlich erfolgt bei noch höherem pH als pH 8 wieder ein rascher Abfall der Geschwindigkeit dieser Reaktion, da ja nach den Untersuchungen von E. Abel bei genügender Alkalinität die Reaktion zwischen Hydroperoxyd und Jod bzw. dem aus dem Jod in alkalischer Lösung, gemäß Gleichung 2, gebildeten Hypo-jodit quantitativ unter Reduktion des Hypo-jodits und Sauerstoffentwicklung sich vollzieht[198]). Die Teilreaktionen, die die Katalasewirkung des Jod-ions bewirken, sind wahrscheinlich folgende:

Siehe Tab. 5

[193]) A. **195**, 228 (1879) und B. **13**, 627 (1880).
[194]) Ph. Ch. **47**, 185 (1904).
[195]) Zeitschr. f. el. Chemie **28**, 489 (1922).
[196]) Journ. of the American Chem. Soc. **40**, 1461 (1918).
[197]) Siehe F. P. Treadwell, „Lehrbuch d. analyt. Chemie" Bd. II, 580 (1923); die peroxydatisch verbrauchte H_2O_2-Menge wurde vorher bestimmt.
[198]) Was auch zur quantitativen Hydroperoxyd-Bestimmung benutzt werden kann; man bekommt aber, wie ich von einigen Versuchen her weiß, leicht zu hohe Werte, da das Hypo-jodit durch jede geringfügige Verunreinigung ebenfalls reduziert wird. Der katalatische Zerfall des Hydroperoxyds findet unter diesen Bedingungen nicht statt, weil die Reaktion nach Gleichung 1 aus Mangel an Wasserstoff-ionen unterbleibt.

(1) $H_2O_2 + 2H\cdot + 2J' = 2H_2O + J_2$	Ist an die Gegenwart einer genügenden Wasserstoff-ionen-konzentration gebunden und verringert selber die Wasserstoff-ionen-konzentration.
(2) $J_2 + 2OH' = J' + JO' + H_2O$	Ist an die Gegenwart einer genügenden Hydroxyl-ionen-konzentration gebunden, außerdem in unserem Fall an das Vorangehen der ersten Reaktion, und verringert selber die Hydroxyl-ionen-konzentration.
(3) $JO' + H_2O_2 = J' + H_2O + O_2$	Ist als Folgereaktion an das Vorangehen der beiden andern geknüpft und bewirkt keine pH-Verschiebung.

Die Addition der drei Gleichungen ergibt, wenn man die rechts und links vorkommenden Größen wegstreicht, $2H_2O_2 = 2H_2O + O_2$, d. h. das Jod-ion, dessen Menge unverändert geblieben ist, hat den katalatischen Zerfall des Hydroperoxyds katalysiert.

Die Verschiedenheit der pH-Abhängigkeit der Teilreaktionen gemäß der Gleichungen 1 und 2 und die Notwendigkeit beider Reaktionen zum Zustandekommen der Katalasewirkung des Jod-ions machen es verständlich, daß diese Reaktion in der Nähe des Neutralpunktes am schnellsten verläuft, wobei gewissermaßen ein ständiges Oscillieren der Wasserstoff-ionen-konzentration um den Neutralpunkt herum erfolgt. Wahrscheinlich spielen aus diesem Grunde aber auch in diesem Fall die Eigenschaften der angewandten Pufferlösung, vor allem die sogenannte Nachgiebigkeit derselben, eine große Rolle. In ungepufferten Lösungen erhielt ich für die zersetzte H_2O_2-Menge einen Wert, der zwischen dem von pH 7,5 und dem von pH 8,1 liegt; unter diesen Bedingungen erwies sich auch die zersetzte H_2O_2-Menge proportional der Jod-ionen-konzentration. Evtl. bestehen überdies noch Beziehungen zwischen der pH Abhängigkeit der Hydroperoxydzersetzung und der Säuredissoziationskonstante des H_2O_2, die von R. A. Joyner[199]) zu $0{,}67 \cdot 10^{-13}$ bei 0° bestimmt worden ist. Die genaue Erforschung dieser Verhältnisse wäre eine Arbeit für sich. Für meine Bedürfnisse genügte es festzustellen, daß bei einem pH kleiner als pH 6 die Jod-ionen-kata-

[199]) Zeitschr. f. anorg. Chemie **77**, 103 (1912).

lase äußerst langsam verläuft, so daß ich bei den Versuchen zur gleichzeitigen Bestimmung der peroxydatischen und katalatischen Wirkung des Hämins ein Reaktionsgemisch mit niedrigem pH gewählt habe, wo man also die Jod-ionen-katalase vernachlässigen kann. Bemerkenswert ist, daß die molare Jod-ionen-konzentration bei günstigstem pH etwa 1000 mal so groß sein muß, wie die von Hämin, um unter den von mir gewählten Bedingungen dieselbe katalatische Wirkung hervorzurufen.

Der scheinbare Temperaturkoeffizient der Häminkatalasewirkung ist durch Vergleich der Halbstundenwerte unter Normalbedingungen bei pH 6,88 und den Temperaturen 0°, 10°, 20°, 30° gewonnen worden; er ist sehr klein und bewirkt nur eine Geschwindigkeitszunahme um ca. 5%, bei 10° Temperaturerhöhung; doch ist es nicht wahrscheinlich, daß man auf diese Weise den wahren Temperaturkoeffizienten der
Siehe Tab. 6
Reaktion erfaßt, sondern einen, der infolge der Katalysatorschädigung, die durch die Temperaturerhöhung vergrößert wird, verfälscht ist. Daß diese Vermutung richtig ist, zeigen auch die später zu besprechenden Schädigungsversuche. Erwähnenswert ist an dieser Stelle, daß in einer neuen Arbeit von S. Morgulis[200]) für enzymatische Katalasewirkung das Temperaturoptimum bei +2° gefunden worden ist. Dieser Befund deutet darauf hin, daß auch beim Enzym die Schädigung des Katalysators durch das Substrat mit steigender Temperatur sehr stark anwächst.

Zur Feststellung der Abhängigkeit der Häminkatalasewirkung von dem Reaktionsvolumen habe ich nur einen einzigen Versuch unternommen, in dem unter sonst gleichen Reaktionsbedingungen des Ge-
Siehe Tab. 7
samtvolumen (100 ccm) nur die Hälfte des üblichen (200 ccm) war. Die Menge des zersetzten Hydroperoxyds war dieselbe wie im Versuch mit dem Volumen von 200 ccm, was erkennen läßt, daß der Hydroperoxydzerfall monomolekular[201]) — polymolekulare Reaktionen sind vom Reaktionsvolumen abhängig — und daß die Affinität zwischen dem Hämin und dem Hydroperoxyd recht groß ist[202]).

---

[200]) S. Morgulis und M. Weber, Journ. biol. Chemistry **72**, 91 (1927).

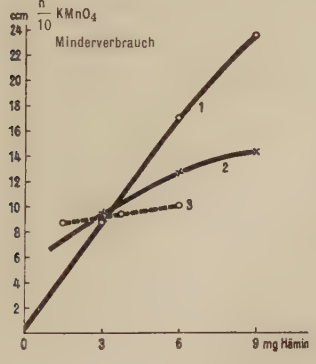
[201]) In Übereinstimmung mit der Kinetik.

[202]) Wie schon auf S. 9 erwähnt, ist die Reaktionsgeschwindigkeit nicht der Katalysatormenge φ, sondern dem Ausdruck $\frac{a-x}{a-x+k} \cdot \varphi$ proportional, und nur wenn k, die Dissoziationskonstante der Katalysator-Substratverbindung klein ist, ist dieser Ausdruck nahezu gleich φ und auch innerhalb eines nicht allzu großen Variationsgebietes von $a-x$ unabhängig von der Substratkonzentration. (Zu bedenken ist aber bei dieser Schlußfolgerung, daß eine durch eine Zunahme an Katalysator-Substratverbindung bedingte Erhöhung der Reaktionsgeschwindigkeit evtl. durch die stärkere Schädigung bei der größten Hydroperoxydkonzentration im kleineren Reaktionsvolumen kompensiert werden kann.)

Die Abhängigkeit der Menge des zersetzten Hydroperoxyds von der Häminkonzentration wird durch Figur 4 gezeigt, deren Kurvenzug 1 die Stundenwerte von durch 3 mg, 6 mg und 9 mg Hämin zersetztem Hydroperoxyd verbindet (pH 5,72). Man sieht, daß eine ungefähre Proportionalität zwischen Katalysatormenge und Umsatz besteht; die etwas zu niedrigen Werte bei höherer Konzentration des Katalysators erklären sich aus kinetischen Gründen (Verarmung an Substrat). Der Kurvenzug 2 gibt etwas anders gemachte Versuche wieder; bei pH 7,93 wird der 3 mg-Versuch 60 Min., der 6 mg-Versuch 30 Min. und der

Siehe Tab. 8

Siehe Tab. 8a



1 Abhängigkeit von der Häminmenge.
2 Gabel (Produkt Häminmenge × Zeit konstant).
3 Gabel (Produkt Hydroperoxydmenge × Zeit konstant; stets 3 mg Hämin).

Figur 4.
Abhängigkeit der zersetzten H_2O_2-Menge von der Hämin- und Hydroperoxydmenge.

9 mg-Versuch 20 Min. laufen gelassen. Man sieht, daß unter diesen Bedingungen (Konstanz des Produktes Häminmenge × Zeit) der Umsatz am größten ist bei dem Versuch mit kürzester Reaktionsdauer; — wieder ein deutlicher Hinweis auf die allmähliche Schädigung des Katalysators, denn sonst müßte die sogenannte Gabel wagerecht verlaufen.

Die Abhängigkeit des Umsatzes von der Hydroperoxydmenge habe ich nur durch einige wenige Versuche bestimmt, die so angestellt wurden, daß das Produkt Hydroperoxydmenge × Zeit konstant war (bei pH 7,93 und 3 mg Katalysator). Auch die so gewonnene gestrichelte Kurve 3 der Figur 4 ist, anstatt wagerecht, nach rechts oben gerichtet; wenn auch nur mit ziemlich geringer Neigung; das bedeutet, daß die Größe der Häminschädigung in etwas stärkerem Maße von der Reaktionsdauer als von der Hydroperoxydkonzentration abhängig ist.

Siehe Tab. 9

Die Wirkung von Neutralsalzen auf die katalatische Wirksamkeit habe ich nicht systematisch, sondern nur durch einige Stichproben untersucht; es hat den Anschein, als ob dieser Einfluß sehr gering ist. So ist z. B. der Zusatz von 500 mg Kaliumpyro-phosphat — das Reaktionsgemisch wird durch diesen Zusatz 0,0076 molar an $K_4P_2O_7$ — ohne jeden Einfluß, was besonders bemerkenswert ist, da nach O. Warburg und O. Meyerhof[203]) Eisenkatalysen durch Kaliumpyro-phosphat spezifisch gehemmt werden. Ebenso ist z. B. Kaliumchlorat ohne jede Wirkung auf die Katalasewirkung des Hämins. Stark herabgesetzt wird die Katalasewirkung des Hämins durch Kaliumjodid; wahrscheinlich handelt es sich dabei aber nicht um eine einfache Neutralsalzwirkung, sondern um die Konkurrenz der peroxydatischen und katalatischen Reaktion, um das durch das Hämin aktivierte Hydroperoxyd. Es wird später noch Gelegenheit sein, auf diesen Fragenkomplex einzugehen.

Die Versuche, die Hemmbarkeit der Häminkatalase durch Blausäure[204]) zu ermitteln, ergaben, daß die Katalasewirkung des Hämins nicht spezifisch durch Blausäure gehemmt wird. Konzentrationen an Kaliumcyanid von derselben Größenordnung wie die Häminkonzentration waren ohne jeden Einfluß, und selbst bei etwa 16 fach größerer KCN-Konzentration betrug die Herabsetzung der Hydroperoxyd-zersetzungs-geschwindigkeit kaum 10%; bei noch höherer KCN-Konzentration — ich bin soweit mit der Erhöhung der zugesetzten KCN-Mengen gegangen, daß auf 1 Atom Fe 1670 Moleküle KCN kamen, (das Reaktionsgemisch ist dann 0,0384 m an KCN) — wird die katalatische Wirksamkeit des Hämins um etwa 60% vermindert[205]). Da aber das zugesetzte Cyankali erst in sehr großen Konzentrationen hemmend wirkt, so dürfte es sich bei der KCN-Hemmung der Katalasewirkung

Siehe Tab. 10

---

[203]) Bio.Z. **146**, 380 (1924) und Bio.Z. **150**, 1 (1924).

[204]) Wegen der weitgehenden Hydrolyse des zugegebenen KCN und der geringen Dissoziation des HCN liegt immer nur ein geringer Teil als Cyanion vor.

[205]) Nach H. v. Euler u. K. Josephson (A. **455**, 1, 1927) ist bei der Hemmung der Leberkatalase durch Blausäure das Verhältnis Eisen zu Blausäure ein ganz ähnliches; wenn auf ein Atom Eisen 1600 Mol Blausäure kommen, so wird die Wirksamkeit auf die Hälfte herabgesetzt. Also auch bei Leberkatalase ist die Empfindlichkeit gegen Blausäure sehr gering. — Ferner soll nach D. C. Harrison (Bio. Chem. Journ. **18**, 1009, 1924) auch die Beschleunigung der Cystinoxydation mit Luft durch Hämin weitgehend unempfindlich gegen Blausäure sein, während die Beschleunigung dieser Reaktion durch ionogenes Eisen, die größer ist als die durch Hämin, durch kleine Mengen Blausäure fast vollständig aufgehoben wird.

nicht um eine Vergiftung des Katalysators handeln, sondern um einen irgendwie andersgearteten Effekt, vielleicht um eine Neutralsalzwirkung, vielleicht um eine pH-Verschiebung oder um das Auftreten einer neuen Reaktion (Oxamidbildung durch Oxydation der Blausäure). Der Gedanke, daß es sich auch bei der Hemmung durch Blausäure um das Auftreten einer Konkurrenzreaktion handelt, wird besonders durch die Tatsache begünstigt, daß KJ und KCN ungefähr in gleichem Maße katalatisch hemmend wirkt (KJ noch etwas stärker). Es soll an dieser Stelle nicht verschwiegen werden, daß die Hemmbarkeit der Häminkatalase durch derartige Konkurrenzreaktionen leichter erklärbar ist, wenn man annimmt, daß die Katalasewirkung eine dimolekulare Reaktion ist, nämlich eine Oxydation von H_2O_2 durch das am Hämin aktivierte Hydroperoxyd, bzw. in der Sprache der Dehydrierungstheorie eine Dehydrierung des aktivierten Hydroperoxyds auf Kosten von unaktiviertem; es würden dann nämlich die Konkurrenzreaktionen nur die Hälfte an Hydroperoxyd verbrauchen wie die eigentliche Katalasereaktion. Aber wie aus dem Vorhergehenden ersichtlich, spricht die Reaktionskinetik der H_2O_2-Zersetzung gegen die Annahme, daß es sich dabei um eine dimolekulare Reaktion handelt[206]). Das Maß, in dem Cyankalium in größerer Konzentration angewandt, hemmend wirkt, variiert übrigens auch mit dem pH, doch scheint es sich dabei um recht komplizierte Verhältnisse zu handeln, da verschiedene KCN-Konzentrationen bei verschiedenem pH maximal hemmend wirken. Es ist aber bei diesen Aussagen noch eine gewisse Reserve notwendig, da die Ungenauigkeit beim Titrieren von $\pm$ 0,3 ccm bei der Angabe der Hemmung in Prozenten eine maximale Unsicherheit von 6% bedingt; so weichen im Durchschnitt auch die beiden Parallelversuche um 1,8% vom Mittelwert ab, und in einem besonders ungünstigen Fall sogar um 3,8%; in den Fällen, wo die Hemmung noch verhältnismäßig gering ist, ist die dadurch bedingte Unsicherheit beim Vergleich der Hemmbarkeit bei verschiedenem pH recht erheblich. Immerhin ist die geringe Empfindlichkeit der Häminkatalase gegen Blausäure ein wichtiges Resultat. O. Warburg[207]) hält die Empfindlichkeit einer katalytischen Reaktion gegen Blausäure für ein Indizium dafür, daß es sich um eine Eisen- bzw. Schwermetallkatalyse handelt. Nun ist für den Fall der Oxalsäureoxydation durch Jodsäure nachgewiesen worden[208]), daß es

[206]) Siehe auch die Unabhängigkeit der Häminkatalase vom Reaktionsvolumen und die stöchiometrischen Verhältnisse bei der gleichzeitigen Peroxydase- und Katalasewirkung des Hämins, wovon das eine für einen monomolekularen Reaktionsverlauf, das andere für einen dimolekularen spricht.

[207]) B. **58**, 1001 (1925).

[208]) O. Warburg, Bio.Z. **174**, 497 (1926) und F. G. Fischer u. C. Wagner, B. **59**, 2384 (1926).

sich, trotz der Empfindlichkeit der Reaktion gegen Blausäure, nicht um eine Eisenkatalyse, sondern um eine Autokatalyse durch Jod handelt; die Empfindlichkeit gegen Blausäure beruht auf der Fähigkeit derselben, mit Jod unter Jod-cyan-bildung zu reagieren. In meinem Fall handelt es sich zweifellos um eine Katalyse durch Eisen in besonderer Bindungsweise, denn die eisenfreien Blutfarbstoffderivate, die Prophyrine, wirken nicht katalatisch, und trotzdem ist die Reaktion gegen Blausäure weitgehendst unempfindlich. Das beweist, daß die Warburgsche Behauptung weder in der Form „Alle durch Blausäure hemmbaren Katalysen sind durch Eisen- bzw. Schwermetall bewirkt", noch in der Form „Alle Eisenkatalysen sind durch Blausäure hemmbar", allgemein gültig ist.

Ein Versuch, die Wirksamkeit des Hämins als Katalase durch Belichtung zu beeinflussen, ergab das Resultat, daß die Belichtung höchstens einen recht geringen Einfluß auf die katalatische Wirksamkeit hat. Die geringfügige Erhöhung (ca. 10%) kann aber auch zum Teil durch die bei der Belichtung eingetretene Temperaturerhöhung oder
Siehe Tab. 11 durch Versuchsfehler erklärt werden; bemerkenswert ist aber immerhin die Tatsache, daß im belichteten Versuch bei pH 7,93 eine fast vollständige Verblassung des Hämins statt hatte, während im unbelichteten Parallelversuch die Farbe am Ende der einstündigen Reaktionsdauer dieselbe war wie zu Anfang. Der Belichtungsversuch wurde übrigens nicht bei 0°, sondern bei Zimmertemperatur (21°) gemacht; zur Bestrahlung verwandte ich eine 600kerzige, N_2 gefüllte Halbwatt-Lampe, die 3 cm von dem kugeligen, 250 ccm fassenden Reaktionsgefäß aus Jenaer Glas aufgestellt war.

Da nach H. Wieland und H. Hausmann[209]) bei Leberkatalase der Entzug der Gasbeladung irreversibel hemmend wirkt, so habe
Siehe Tab. 11 ich auch untersucht, ob die Wirksamkeit des Hämins als Katalase bei pH 7,93 unter Atmosphärendruck und bei 15 mm Hg voneinander verschieden sind. Innerhalb der analytischen Fehlergrenze stimmten die beiden Versuche miteinander überein, was ja nicht sonderlich verwunderlich ist, da das Hämin im Gegensatz zur Leberkatalase echt gelöst ist, und die Hemmung durch Entzug der Gasbeladung bei der Leberkatalase wahrscheinlich auf einer Änderung des kolloidalen Zustandes beruht.

2. Die katalatischen Wirkungen des „Pyridin-hämins".

Eine viel einschneidendere Änderung der Verhältnisse als durch die bisher erwähnten Maßnahmen wird bewirkt, wenn man das Hämin

[209]) A. **445**, 181 (1925).

anstatt in Na_2HPO_4 in Pyridin auflöst. Um mir im folgenden die umständliche Bezeichnungsweise zu ersparen, werde ich in $\frac{m}{50}$ Na_2HPO_4 aufgelöstes Hämin als „Na_2HPO_4-hämin" bezeichnen und Hämin, das in 1½%igem Pyridin aufgelöst worden ist, als „Pyridin-hämin".

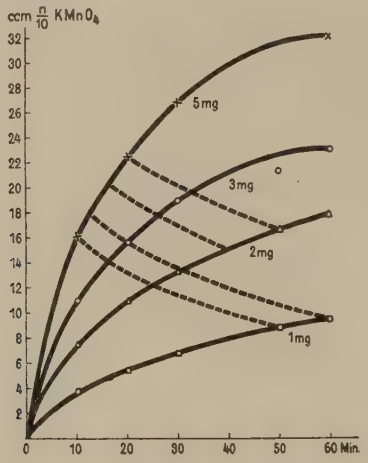
„Pyridin-hämin" ist sowohl katalatisch als auch peroxydatisch viel wirksamer, als „Na_2HPO_4-hämin". Da aber „Pyridin-hämin" nicht nur ca. 3,5 fach katalatisch wirksamer ist als „Na_2HPO_4-hämin", sondern auch eine ganz andere Abhängigkeit vom pH hat, außerdem auch einen noch viel stärkeren Anfangsabfall der Geschwindigkeits-Konstanten der Reaktion aufweist, so ist anzunehmen, daß die Aktivierung des Hämins durch das Pyridin so zustande kommt, daß aus dem Hämin ein ganz neuartiger Katalysator wird. In Übereinstimmung hiermit stehen auch die optischen Befunde, und im Abschnitt über die Konstitution des Hämins habe ich ja die Gesamtheit der Erwägungen, die zur Annahme führen, daß das Einwirkungsprodukt des Pyridins auf Hämin eine stabilisierte, radikalartige Verbindung, aber nicht Hämochromogen ist, ausführlich diskutiert.

Die „Pyridin-hämin"-Lösungen wurden dargestellt durch Auflösen von 100 mg Hämin in 5 ccm 30%igem Pyridin, worin sich das Hämin schon in der Kälte klar löst; die Lösung wurde dann auf 100 ccm verdünnt, wodurch die Pyridinkonzentration auf 1,5% zurückgeht; der dabei entstehenden Trübung wurde nicht geachtet, aber jedesmal vor dem Herauspipettieren aus der Lösung wurde kräftig umgeschüttelt. Über die allmähliche Zunahme der Wirksamkeit dieser Lösung und über Versuche mit in Pyridin anderer Konzentration aufgelöstem Hämin wird später zu berichten sein. Der Versuchsansatz wurde genau so gemacht, wie in den Versuchen mit „Na_2HPO_4-hämin", nur, daß als Katalysator „Pyridin-hämin" benutzt wurde, im gewöhnlichen Versuch ebenfalls 3 mg Hämin.

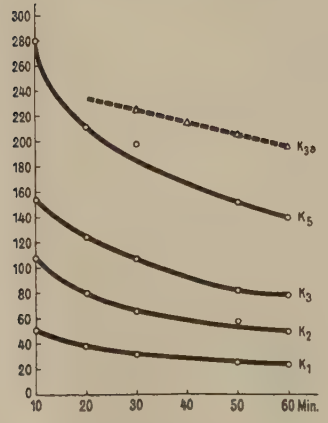
Über die Kinetik der Katalasewirkung liegen recht zahlreiche Messungen vor, die alle aus noch später zu erwähnenden Gründen bei pH 5,72 gemacht worden sind. Siehe Tab. 12

Figur 5 gibt die Zeit-Umsatzbeziehung bei 1, 2, 3 und 5 mg angewandtem Katalysator wieder. Die gestrichelten Kurven sind sogenannte Gabeln; sie verbinden Punkte, für die das Produkt aus Zeit × Katalysatormenge konstant ist; sie weisen alle nach abwärts — ein Zeichen für die Schädigung des Katalysators während des Reaktionsablaufes. Die Konstanten der Reaktionsgeschwindigkeit sind der Menge des angewandten Katalysators proportional, zeigen aber einen sehr starken Abfall mit der Zeit, dieser geht Hand in Hand mit einem Farbumschlag; die ursprünglich rote, das Hämochromogenspektrum zeigende

Lösung nimmt allmählich wieder die braune Farbe, die auch „Na_2HPO_4-
Siehe Tab. 12a hämin“ zeigt, an. Aber auch dann noch ist „Pyridin-hämin“ wirksamer als „Na_2HPO_4-hämin“.

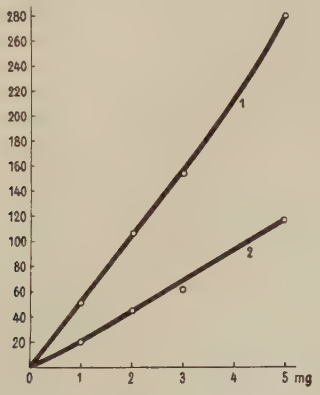


Figur 5.
Kinetik der Katalasewirkung des Pyridinhämins.



Figur 6.
Der Abfall der Geschwindigkeitskonstanten der „Pyridin-hämin“-Katalasewirkung.

In Figur 6 ist der Abfall der Konstanten mit der Zeit wiedergegeben, zur Berechnung diente immer das Zeitintervall $t_1 = 0$ Min. und $t_2 = x$ Min. (Wert der Abszisse in der Zeichnung); die Nummern der Kurvenzüge stimmen überein mit der Zahl der angewandten Milligramme Katalysator. Kurvenzug 3a gibt den Abfall der Geschwindigkeitskonstanten bei „Na_2HPO_4-hämin" (3 mg) wieder (er ist also identisch mit dem gestrichelten Kurvenzug der Figur 1 Seite 68 und daher auch hier gestrichelt gezeichnet); damit er aber in diese Figur überhaupt hineinpaßt, ist er mit gegenüber den Kurvenzügen des „Pyridin-hämins" zehnfach vergrößertem Ordinatenmaßstab gezeichnet, er zeigt deutlich den weitaus langsameren Abfall der Konstanten beim „Na_2HPO_4-hämin" als beim „Pyridin-hämin"; andererseits veranschaulicht die Tatsache, daß ein zehnfach größerer Ordinatenmaßstab zu seiner Wiedergabe benutzt worden ist, die erheblich größere Wirksamkeit vom „Pyridin-hämin". Dies tritt besonders bei kurzer Reaktionsdauer in Erscheinung, aber auch noch nach dem anfänglich schnelleren Abfall beim „Pyridin-hämin" ist immer noch das „Pyridin-hämin" dem „Na_2HPO_4-hämin" in bezug auf seine katalatische Wirksamkeit weitaus überlegen.



Figur 7.
Geschwindigkeitskonstanten der „Pyridin-hämin"-Katalasewirkung als Funktion der Häminmenge.

Figur 7 gibt die Abhängigkeit der Reaktionskonstanten von der Konzentration des Katalysators wieder; die Tatsache, daß die Werte, deren Ausrechnung immer völlig gleichartig erfolgte, annähernd auf einer Graden liegen, zeigt, daß die Konstanten proportional der Hämin- Siehe Tab. 12b konzentration sind. Kurve 1 gibt die Konstanten, wie sie sich aus dem

Zeitintervall $t_1 = 0$ Min. bis $t_2 = 10$ Min., Kurve 2, wie sie sich aus dem Zeitintervall $t_1 = 10$ Min. bis $t_2 = 50$ Min. ergeben; man sieht, daß die Werte der zweiten Kurve nicht ganz 50% von denen der ersten Kurve betragen. Selbstverständlich habe ich in Leerversuchen geprüft, ob dem Pyridin als solchem katalatische Wirksamkeit zukommt. Das ist nicht der Fall, und wenn man ganz reines Pyridin[210]) verwendet, so hat es auch keinen Eigenverbrauch an Permanganat. Die pH-Verschiebung, die durch das Pyridin bewirkt sein kann, ist in allen Versuchen, außer in dem mit in 100%igem Pyridin gelösten Hämin, geringfügig, da ja die Pyridin-konzentration im Vergleich zu den Pufferkonzentrationen klein ist. Aus einer Überschlagsrechnung, bei der ich für das Pyridin dieselbe Basizität angenommen habe wie für Natriumhydroxyd, ergibt sich die Verschiebung zu maximal 0,2 pH-Einheiten; wahrscheinlich ist sie aber, da ja Pyridin weitaus schwächer basisch ist als NaOH, erheblich geringer[211]).

Die pH-Kurve der Katalasewirkung des „Pyridin-hämins" ist eine ganz andere als die des „Na_2HPO_4-hämins".

Siehe Tab. 13

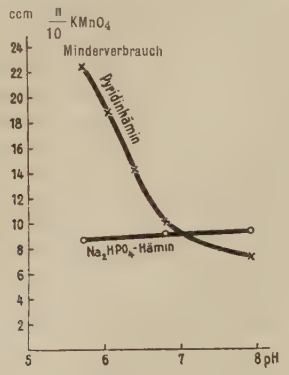
Figur 8 gibt in der einen Kurve die Abhängigkeit der „Pyridin-hämin"wirkung vom pH wieder, während die andere Kurve als Vergleich noch einmal die Verhältnisse bei einer gleichkonzentrierten, gealterten „Na_2HPO_4-hämin"-lösung darstellt. Es nimmt die katalatische Wirksamkeit des „Pyridin-hämins" mit zunehmendem pH sehr schnell ab, beim Neutralpunkt ist sie ungefähr gleich groß wie die des „Na_2HPO_4-hämins", und bei pH 7,93 hat sogar „Pyridin-hämin" eine geringere Wirksamkeit als „Na_2HPO_4-hämin". Wahrscheinlich beruht diese starke Wirksamkeitsabnahme beim „Pyridin-hämin" mit zunehmendem pH darauf, daß die beim Auflösen des Hämins in Pyridin entstehende Komplexverbindung in alkalischem Medium nicht beständig ist; so schlägt auch bei pH 7,93 die rote, hämochromogenartige Farbe des „Pyridin-hämins" äußerst rasch in die braune Farbe des alkalischen Hämatins um, auch in Abwesenheit von Hydroperoxyd, während bei pH 5,72 dieser Farbumschlag in Abwesenheit von Hydroperoxyd überhaupt nicht eintritt und in Anwesenheit von Hydroperoxyd auch erst allmählich. Über die katalatische Wirksamkeit des „Pyridin-hämins"

---

[210]) Siehe auch später bei den Versuchen in 75%igem Pyridin.

[211]) Eine direkte elektrometrische Messung des pH ist wegen der Elektrodenvergiftung durch Pyridin nicht möglich, eine kolorimetrische in Gegenwart des Hämins wegen dessen Eigenfarbe äußerst ungenau. Ich habe deshalb bei den „Pyridin-hämin"-versuchen dieselben pH-Werte eingesetzt wie bei den entsprechenden „Na_2HPO_4-hämin"-versuchen. Es wäre aus den oben erwähnten Gründen eine gewisse, sicher aber nicht große Korrektur notwendig, die ich aber, da ich ihre Größe nicht kenne, nicht vornehmen kann.

bei kleinerem pH als pH 5,72 habe ich mich nur durch einen Versuch bei pH 2,35 orientiert. Es ist in so saurem Gebiet die Wirksamkeit des „Pyridin-hämins“ nur noch halb so groß wie bei pH 5,72; es besitzt die pH-Kurve der katalatischen Wirkung des „Pyridin-hämins“ also zwischen pH 2,35 und pH 5,72 ein Maximum, über dessen genaue Lage ich leider infolge Mangels von Versuchen in dem dazwischenliegenden Aciditätsgebiet nichts aussagen kann.



Figur 8.
pH-Kurve der Katalasewirkung des „Pyridin-hämins“.

Merkwürdig ist die Erscheinung, daß die katalatische Wirkung des „Pyridin-hämins“ in den ersten Tagen nach der Herstellung der Katalysatorlösung langsam zunimmt; es sind diese Beobachtungen alle bei pH 5,72 gemacht worden; es ist das eine Acidität, die wahrscheinlich dem optimalen pH der „Pyridin-hämin“-katalasewirkung sehr naheliegt. Nach etwa 5 Tagen hat diese Zunahme ihr Ende erreicht; sie beträgt etwa 25% des Anfangswertes. Dieser Vorgang ist verbunden mit dem allmählichen Klarerwerden der durch das Verdünnen getrübten Katalysatorlösung; es ist anzunehmen, daß es sich dabei um eine Änderung des kolloidalen Zustands der Katalysatorlösung handelt; es erinnert dieser ganze Erscheinungskomplex an ähnliche Erfahrungen, die R. Willstätter[212]) bei den pflanzlichen Peroxydasen gemacht hat. Siehe Tab. 14

Wenn man dem Reaktionsgemisch eines Katalaseversuchs mit „Na_2HPO_4-hämin“ als Katalysator dieselbe Pyridinmenge zusetzt, wie

[212]) R. Willstätter u. A. Stoll, A. **416**, 51 (1918) und R. Willstätter u. A. Pollinger, A. **430**, 287 (1923) und R. Willstätter u. H. Weber, A. **449**, 171 (1926).

sie die Versuche mit „Pyridin-hämin" enthalten (das Reaktionsgemisch enthält 0,0225% Pyridin, entsprechend einer Molarität von 0,0028),
Siehe Tab. 15 so erhöht man dadurch die in einer Stunde durch „Na_2HPO_4-hämin" zersetzte Hydroperoxydmenge um etwa 30%; doch ist dieser Effekt nur ungefähr ein Viertel desjenigen, den man durch Verwendung von „Pyridin-hämin" anstatt von „Na_2HPO_4-hämin" als Katalysator erzielt. Man hat hier den bemerkenswerten Fall, daß die Reaktionsgeschwindigkeit in zwei Versuchsansätzen, deren qualitative und quantitative Zusammensetzung identisch ist, recht beträchtlich voneinander verschieden sind. Es hängt also die Reaktionsgeschwindigkeit von der Vorgeschichte des Reaktionsgemisches ab. Dem entspricht, daß man auch, wenn man das Pyridin und das Hämin erst nachträglich (d. h. im Reaktionsgemisch und nicht schon bei der Herstellung der Katalysatorlösung) zusammenbringt, nicht das Auftreten des roten hämochromogenartigen Farbtons beobachten kann. Ich glaube nicht, daß sich die Aktivierung des Hämins durch nachträglich zugesetztes Pyridin durch die geringfügige pH-Verschiebung im Reaktionsmilieu erklären läßt, da ja die katalatische Wirkung nur in sehr geringem Maße pH-abhängig ist, sondern daß man annehmen muß, daß auch in diesem Fall sich eine Komplexverbindung zwischen dem Pyridin und dem Hämin bildet, aber natürlich ein andere als die, die bei der Auflösung des Hämins in Pyridin entsteht. Daß nach dem Farbumschlag des „Pyridin-hämins" dieselbe Komplexverbindung aus dem hämochromogenartigen Radikal entsteht wie die, die sich durch nachträgliche Aktivierung des „Na_2HPO_4-hämins" mit Pyridin bildet, ist aus den vorliegenden Versuchen nicht mit Sicherheit zu folgern, wenn auch theoretische Erwägungen und gewisse experimentelle Befunde dafür sprechen [213]).

Um die Abhängigkeit der Wirksamkeit des in Pyridin gelösten Hämins von der Pyridinkonzentration der Katalysatorlösung zu untersuchen, habe ich Hämin nicht nur in 1,5%igem Pyridin, sondern auch in 2,5%igem, in 15%igem und in 100%igem Pyridin aufgelöst und diese Katalysatorlösungen bei pH 5,72 auf ihre katalatische Wirksamkeit
Siehe Tab. 16 untersucht. Es waren übrigens die Lösungen in 1,5%igem und in 2,5%igem Pyridin 0,1%ig an Hämin, während die in 15%igem und in 100%igem Pyridin 1%ig an Hämin waren; es mußte aus diesem Grunde in den beiden letzten Fällen dem Reaktionsgemisch nur 0,3 ccm Katalysatorlösung zugesetzt werden (unter Verwendung einer Mikropipette), während ja sonst 3 ccm Katalysatorlösung verwendet wurden. Dadurch wurde erreicht, daß in dem Fall, wo in 15%igem Pyridin aufgelöstes

---

[213]) Eine eingehende Diskussion dieser komplizierten Verhältnisse würde hier zu weit führen.

Hämin verwandt wurde, das Reaktionsgemisch dieselbe Zusammensetzung hatte wie in den üblichen „Pyridin-hämin"-versuchen. Trotzdem war die zersetzte Hydroperoxydmenge nur 78% von der im „Pyridin-hämin"-versuch, obgleich auch hier nur in der Vorgeschichte eine Verschiedenheit besteht. Das zeigt, wie kompliziert die Vorgänge bei der Auflösung des Hämins in Pyridin sind. Vielleicht erfolgt in der konzentrierteren Lösung unter dem Einfluß des Pyridins wenigstens zum Teil eine Salzsäure-abspaltung aus dem Hämin und Bildung des Dehydrochlorid-hämins W. Küsters[214]), während in verdünnterer Pyridinlösung eine derartige Reaktion nicht statt hat. In dem Versuch mit in 2,5%igem Pyridin gelöstem Hämin war die zersetzte Hydroperoxydmenge noch um ca. 11% größer als im „Pyridin-hämin"-versuch, während bei Verwendung von in 100%igem Pyridin gelöstem Hämin der Umsatz kaum 60% von dem im „Pyridin-hämin"-versuch erreicht[215]). Die Zahl der über den Einfluß des Pyridingehalts der Katalysatorlösung auf die Wirksamkeit des Katalysators angestellten Versuche reicht nur aus zur Angabe, daß die optimale Konzentration des Pyridins über 1,5% und unter 15% liegen muß, nicht aber zur präziseren Angabe des Optimums. Im Gegensatz zum „Na_2HPO_4-hämin" bewirkt beim „Pyridin-hämin" und auch bei dem in100%igem Pyridin gelösten Hämin ein längeres Erwärmen auf 90° keine Veränderung der katalatischen Wirksamkeit.

Versuche mit in 100%igem Piperidin und Anilin aufgelöstem Hämin zeigten, daß bei pH 5,72 die Wirksamkeit von in Piperidin aufgelöstem Hämin kleiner ist als von „Na_2HPO_4-hämin"; in Anilin aufgelöstes Hämin zeigte eine noch viel kleinere Wirksamkeit, doch spielte bei diesem Versuch sicher die Tatsache der Nichthomogenität des Reaktionsgemisches eine wichtige Rolle. Siehe Tab. 17

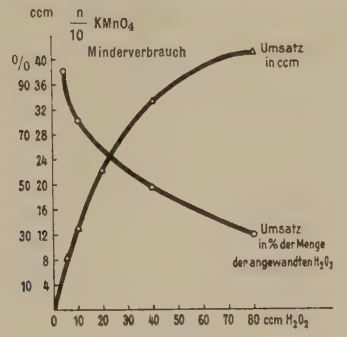
Die Umsatzkurve in Kubikzentimeter der Figur 9 gibt die Beziehung zwischen der Menge des angewandten und des zersetzten Hydroperoxyds an; man sieht, daß bei einer Versechszehnfachung der angewandten Menge nur eine Verfünffachung der zersetzten Menge stattfindet. Bei größerer Hydroperoxyd-konzentration erleidet der Katalysator eine stärkere Schädigung als bei geringerer. Noch stärker kommt das in der Kurve des prozentualen Umsatzes der Figur 9 zum Ausdruck; Siehe Tab. 18

---

214) H. **40**, 408 (1903/04).

215) In diesem Versuch kann evtl. die pH-Verschiebung durch das Pyridin beträchtlich und von Einfluß sein, nicht aber in den anderen Versuchen; bei dem Versuch in 2,5%igem Pyridin würde eine pH-Verschiebung nach der pH-Kurve des „Pyridin-hämins" nicht umsatzerhöhend, sondern -erniedrigend wirken. Der beobachtete Effekt kann also nicht auf einer pH-Verschiebung beruhen.

sie gibt die Hydroperoxydzersetzung in Prozenten der angewandten Hydroperoxydmenge wieder. Anstatt wagerecht zu verlaufen, zeigt die Kurve ganz stark nach abwärts. Ganz ähnliche Verhältnisse hat H. Wieland[216]) bei den peroxydatischen Wirkungen von Ferro-eisen auf die Reaktion zwischen Hydroperoxyd und Oxysäuren beobachtet; er erklärt seinen Befund mit der Annahme, daß durch die größere H_2O_2-Konzentration das Eisen vorzeitig aus seiner Komplexbildung herausgespalten wird, welche Erklärung sich auch sehr gut auf die Katalysen durch die Blutfarbstoffderivate anwenden läßt.



Figur 9.
Einfluß der H_2O_2-Menge auf die Katalasewirkung des „Pyridin-hämins".

3. Versuche in 75%igem Pyridin.

Da es bei den später zu behandelnden Vergleichen der katalatischen Wirksamkeit verschiedener Blutfarbstoffderivate darauf ankam, möglichst jeden Einfluß, der auf Verschiedenheiten des Lösungszustandes beruhen könnte, auszuschalten und da in wässerigem Medium, wenigstens bei pH 5,72, wo aber z. B. das „Pyridin-hämin" viel wirksamer ist als in alkalischerem Milieu, zumeist nur kolloidale Lösungen der Blutfarbstoffderivate vorliegen, so habe ich nach einer Möglichkeit gesucht, den Vergleich in einem solchen Medium durchzuführen, in dem die Blutfarbstoffderivate bestimmt echt gelöst sind. Als geeignet erwies sich 75%iges Pyridin. Die Versuche wurden folgendermaßen angestellt: 19,94 ccm (bzw. 19,82 ccm) reinstes Pyridin[217]) wurden mit 5 ccm

[216]) Vortrag bei der Tagung der Münchner Chem. Gesellschaft am 3. Juni 1927. Inzwischen erschienen, und zwar H. Wieland und W. Franke, A. 457, 1, 1927.

[217]) Diese genauen Volumina wurden so gewonnen, daß mit einer reichsgeeichten Pipette 20 ccm in das Gefäß hineinpipettiert wurden und danach mit einer Mikropipette wieder 0,06 bzw. 0,18 ccm herausgenommen wurden.

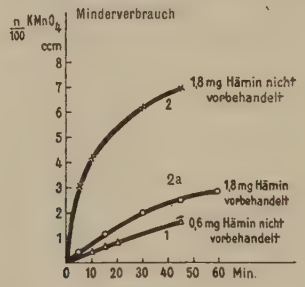
0,085 n H_2O_2 gemischt und in schmelzendem Eis auf 0° abgekühlt. Zu diesem Reaktionsgemisch wurde in genau gestopptem Zeitpunkt 0,06 ccm (bzw. 0,18 ccm) einer 1%igen Häminlösung in konzentriertem Pyridin zugegeben; die Konzentration des Hydroperoxyds im Reaktionsvolumen war bei diesen Ansätzen in 75%igem Pyridin dieselbe wie in den Versuchen in wässerigem Medium, nämlich 0,017 n. Zu den angegebenen Zeiten wurden 5 ccm aus dem Reaktionsgemisch herauspipettiert, in verdünnte Schwefelsäure hineingegeben und dann mit $\frac{n}{100}$ $KMnO_4$ titriert; der Eigenverbrauch des Hämins wurde vorher bestimmt und dann jeweils berücksichtigt. Die Bestimmungsgenauigkeit war $\pm$ 0,5 ccm $\frac{n}{100}$ $KMnO_4$, der maximale Fehler also ungefähr 10%, Wenn man ganz reines Pyridin verwendet, so reduziert es in der Kälte $KMnO_4$ nicht; bei Verwendung von unreinem Pyridin (Homologengehalt!) bekommt man unreproduzierbare Resultate; übrigens ist das „Pyridin reinst" von C. A. F. Kahlbaum für diese Zwecke genügend rein, so daß eine Reinigung nach F. Arndt[218]) über das Perchlorat nicht notwendig ist. Eine Angabe über das pH der 75%igen Pyridinlösung läßt sich nicht machen, da weder eine elektrometrische Messung noch eine kolorimetrische Bestimmung des pH möglich ist. (Die Indikatoren zeigen in 75%igem Pyridin ganz andere Umschlagspunkte als in wäßrigen Lösungen, was auch aus theoretischen Gründen sehr leicht verständlich ist; so bleibt z. B. Phenolphtalein farblos.) Auch aus der zu $10^{-13,6}$ angegebenen basischen Dissoziationskonstante[219]) des Pyridins läßt sich das pH der Lösung nicht ohne weiteres berechnen, da nämlich dieser Wert nur für verdünnte wäßrige Lösungen gilt, in so hoch konzentrierten Pyridinlösungen aber infolge Änderung der Dielektrizitätskonstante des Mediums sicherlich ganz andere Verhältnisse vorliegen. Dieser Mangel ist aber insofern nicht schwerwiegend, da ja bei den in 75%igem Pyridin durchgeführten Vergleichen alle Versuche in denselben Medien sich abspielen, dessen pH durch die sich vollziehenden Reaktionen sicher nur äußerst wenig verändert wird. Die Kinetik der sich unter diesen Bedingungen vollziehenden Hydroperoxydzersetzung gibt Figur 10 wieder.

Kurvenzug 1 verbindet die Werte, die man bei Verwendung von 0,6 mg Hämin (0,037 Millimol im Liter), Kurvenzug 2 die, die man bei Verwendung von 1,8 mg (0,111 Millimol im Liter) erhält. Eine Leerreaktion ist in den angegebenen Zeiten und unter den angegebenen Siehe Tab. 19

[218]) F. Arndt u. P. Nachtwey, B. **59**, 448 (1926).

[219]) W. M. Clark, „The Determination of Hydrogen Ions", Baltimore 1923, S. 463.

Bedingungen nicht in Rechnung zu setzen, wovon ich mich durch einen Versuch überzeugt habe. Die Maßzahlen der Kurven bedeuten in diesem Fall ccm $\frac{n}{100}$ $KMnO_4$ Minderverbrauch. (Der Eigenverbrauch des Hämins an $KMnO_4$ ist stets berücksichtigt.) Man kann aus den beiden Kurven ersehen, daß keine Proportionalität zwischen Katalysatormenge und zersetzter Hydroperoxydmenge besteht. Eine Verdreifachung der Häminmenge bewirkt nahezu eine Verzehnfachung der zersetzten H_2O_2-Menge. Es scheint die Wirksamkeit des Katalysators eine Funktion



Figur 10.
Kinetik der Häminkatalasewirkung in 75%igem Pyridin.

des Quotienten Katalysatormenge: Hydroperoxydkonzentration zu sein; dies ist wohl so zu deuten, daß der Katalysator während der Reaktion eine Oxydation erfährt und dabei in andere Stoffe übergeht; diese haben aber wohl auch noch katalatische Wirksamkeit, wenn auch geringere als das ursprüngliche Produkt; es können nun aber bei einer Änderung des Quotienten Katalysatormenge: Hydroperoxydkonzentration evtl. ganz verschiedenartige Oxydationsprodukte des Hämins entstehen. Der Farbumschlag von rot nach braun erfolgt in 75%igem Pyridin noch schneller als im wäßrigen Medium; außerdem verblaßt allmählich auch die braune Farbe, vor allem in den Versuchen mit nur 0,6 mg Katalysator. Der Abfall der Reaktionsgeschwindigkeit ist sehr erheblich; in den ersten Minuten, solange der hämochromogenartige Katalysator noch vorhanden ist, ist die Wirksamkeit am größten. Das beweist am besten der durch Kurvenzug 2a in Figur 10 (s. oben) wiedergegebene Versuch; er stellt die Kinetik des Hydroperoxydzerfalls in Anwesenheit von Hämin dar, wenn man Hämin anwendet, das schon für einen Versuch verwandt worden war. Ich habe zu diesem Zweck 20 ccm Pyridin, die 1,8 mg Katalysator enthielten, mit nur 2,5 ccm 0,17 n-H_2O_2 versetzt; nach vier Stunden, in dieser Zeit ist, wie ich im Parallel-

versuch festgestellt habe, das Hydroperoxyd quantitativ zersetzt, habe ich dann erneut 2,5 ccm 0,17 n H_2O_2 zugesetzt und die Kinetik ihrer Zersetzung verfolgt (es ist dann der Versuchsansatz völlig gleichartig wie im Normalversuch in 75%igem Pyridin, da ja sonst 5 ccm 0,085 n-H_2O_2 verwandt werden). Es beträgt aber in diesem Versuch die Reaktionsgeschwindigkeit in den ersten 10 Minuten kaum $^1/_6$ von der, die man bei Verwendung von Hämin, das nicht mit Hydroperoxyd vorbehandelt worden war, erhält. Allmählich wird aber der Unterschied der beiden Reaktionsgeschwindigkeiten geringer. Ein interessantes Faktum ist, daß man für die Hydroperoxydzersetzung in 75%igem Pyridin durch 1,8 mg unvorbehandeltes Hämin recht gute Geschwindigkeitskonstanten zweiter Ordnung bekommt, während man für die Geschwindigkeitskonstanten erster Ordnung absolut nichtstimmende Resultate erhält. Ich bin aber der Ansicht, daß es nicht zulässig ist, hieraus irgendwelche Schlüsse zu ziehen; es kann dieses Ergebnis sehr gut ein zufälliges, durch Überlagerung des Einflusses der Katalysatorveränderung über die eigentliche Reaktionskinetik bedingtes sein.

Während ich es bei den Versuchen in wäßrigem Medium nicht für notwendig hielt, meine durch die permanganometrische Titration gewonnenen Werte durch eine gasvolumetrische Bestimmung zu bestätigen [219a]), da der durch völlige Verbrennung des Hämins zu Wasser und Kohlensäure — und die findet ja bestimmt nicht statt — vorgetäuschte Effekt selbst unter Berücksichtigung, daß dann der Eigenverbrauch des Hämins an $KMnO_4$ fortfällt, höchstens nur 10% der beobachteten Hydroperoxydabnahme ausmachen könnte, so habe ich eine solche Überprüfung in den Versuchen in 75%igem Pyridin für notwendig erachtet, da in diesen Versuchen der vorgetäuschte Effekt maximal 33% des beobachteten ausmachen könnte. Ich habe den sich entwickelnden Sauerstoff in einem Azotometer aufgefangen, und obwohl ich keinerlei Maßnahme ergriffen hatte, um eine Übersättigung des Pyridins mit Sauerstoff zu verhindern, habe ich über 60% des erwarteten Sauerstoffvolumens gefunden. Es erlaubt dieser mehr qualitative Versuch natürlich nicht, genau anzugeben, wieviel Prozente der auf permanganometrischem Wege festgestellten Hydroperoxydabnahme auf die katalatische Wirkung des Hämins zurückzuführen ist, wieviel Prozent auf die gleichzeitig verlaufenden Oxydationsvorgänge; immerhin ist es aber sicher, daß der weitaus größte Teil der Hydroperoxydabnahme auf der katalatischen Wirksamkeit des Hämins beruht.

[219a]) In einer augenblicklich im Druck befindlichen Arbeit von R. Kühn und A. Wassermann wird die gasvolumetrische Methode für die Untersuchung der katalatischen Wirksamkeit des Hämins verwandt.

4. Die peroxydatischen Wirkungen des Hämins.

Ich gehe jetzt zu der Beschreibung der peroxydatischen Wirksamkeit des Hämins bei der Jodwasserstoff-oxydation durch Hydroperoxyd über. Der Versuchsansatz wurde völlig gleichartig wie in den Katalaseversuchen gemacht. Nur enthielt das 200 ccm betragende Reaktionsgemisch 10 ccm einer 0,42 n KJ-Lösung (hergestellt durch Einwiegen von Merckschem Kaliumjodid zur Analyse) und 3 ccm einer halbprozentigen Stärkelösung. Da KJ und H_2O_2 auch ohne Gegenwart eines Katalysators miteinander reagieren, erfolgte stets als letztes im Moment der Zeitstoppung die Zugabe des Hydroperoxyds; der Katalysator wurde kurz vorher zugegeben, aber selbst ein längeres Verweilen des Katalysators im Reaktionsgemisch — in Abwesenheit von Hydroperoxyd — war, wie in einem besonderen Versuch festgestellt wurde, ohne Einfluß. Die Titration des freiwerdenden Jods erfolgte fortlaufend mit $\frac{n}{10}$ Thiosulfat; zu den angegebenen Zeiten wurde der Bürettenstand abgelesen und notiert. Besondere Versuche (bei pH 5,72) zeigten, daß diese fortlaufende Titration nicht unbedingt notwendig ist, denn man erhält denselben Wert für den Stundenwert der peroxydatischen Häminwirkung, ob man das freigemachte Jod erst nach Ablauf dieser Stunde oder während der ganzen Zeit fortlaufend titriert. Die Erkennung des Umschlagspunktes beim Titieren (blaue Jodstärkefarbe — braune Häminfarbe) macht bei Verwendung von Stärke, die einen reinblauen Farbton gibt und bei genügender Beleuchtung des Gefäßes mit dem schmelzenden Eis (am besten verwendet man einen innen weiß emaillierten Topf) keinerlei sonderliche Schwierigkeiten. Die Titrationsgenauigkeit ist $\pm 0{,}1$ ccm, das sind 1,5—2,5% des Gesamtumsatzes (je nach dem pH). Da aber die peroxydatische Beschleunigung der Reaktion durch die Differenz zwischen dem Umsatz und der Reaktion mit und ohne Katalysator bestimmt werden muß, und diese Differenz nur etwa $^1/_6$ bis $^1/_3$ des Gesamtumsatzes ausmacht, und außerdem der Fehler von $\pm 0{,}1$ ccm in jede der beiden Bestimmungen eingeht, so ist der Maximalwert des möglichen Fehlers leider 10—20% und der wahrscheinliche Fehler auch noch immer 5—10%. Als Ausdruck für die peroxydatische Wirksamkeit des Hämins wird der Stundenwert der Mehrausscheidung von Jod, ausgedrückt in ccm $\frac{n}{10}$ Thiosulfat, gegenüber der Leerreaktion angegeben. Auch in den Kurven ist immer, wenn nichts anderes angegeben ist, der Stundenwert eingetragen (Abszisse = ccm verbrauchtes $\frac{n}{10}$ $Na_2S_2O_3$ bzw. = der Differenz zwischen Kata-

lysatorversuch und Lehrversuch in $\frac{n}{10}$ $Na_2S_2O_3$). Ein Versuch, die Genauigkeit der Bestimmungen durch Erhöhung der Häminmenge (es würde dann das Verhältnis von Geschwindigkeitszuwachs zu Gesamtgeschwindigkeit günstiger), scheitert daran, daß damit gleichzeitig infolge der stärkeren Färbung des Reaktionsgemisches auch der Umschlagspunkt beim Titrieren schlechter zu erkennen ist. Eine Erhöhung der Konzentration der beiden Reaktionsteilnehmer würde die Verhältnisse nur ungünstiger gestaltet haben, da dadurch die Geschwindigkeit der Leerreaktion schneller anwächst als die der katalysierten Reaktion. Die Verwendung von $\frac{n}{100}$ Thiosulfat würde durch die leichte Veränderlichkeit seines Titers neue Fehlerquellen hervorrufen, und so mußte ich den wahrscheinlichen Fehler von 5 bis 10% wohl oder übel mit in den Kauf nehmen.

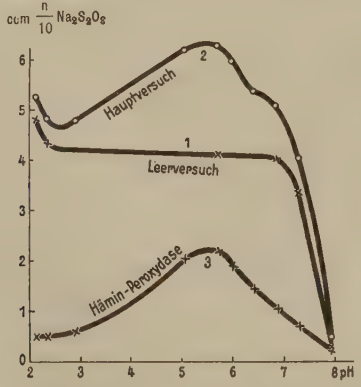
Über die Leerreaktion war schon gesagt worden, daß ich in Übereinstimmung mit den exakten Messungen von A. A. Noyes gefunden habe, daß die Anfangsgeschwindigkeit der Reaktion der Kaliumjodid- und der Hydroperoxyd-konzentration direkt proportional ist, was beweist, daß es ein dimolekularer und nicht ein trimolekularer Vorgang ist, der die Reaktionsgeschwindigkeit bestimmt. Die Variation der Hydroperoxydkonzentration ging bis zu 1 : 16, die der Kalium-jodid- Siehe Tab. 20
konzentration bis zu 1 : 8. Im Einklang mit der Dimolekularität der Siehe Tab. 20a
Reaktion steht die Tatsache, daß die Halbierung des Reaktionsvolumens
eine Verdoppelung der Anfangsgeschwindigkeit mit sich bringt[220]). Da Siehe Tab. 21
selbst in einer Stunde durch die Jodausscheidung nur ca. 10% des Hydroperoxyds und des Kaliumjodids verbraucht werden, so ist die während der Reaktion eintretende Veränderung der Konzentrationen der Reaktionsteilnehmer nicht sehr beträchtlich, und daher der Umsatz annähernd der Geschwindigkeitskonstante proportional.

Dies gilt auch bei der durch Kurve 1 der Figur 11 wiedergegebene Abhängigkeit der Menge des ausgeschiedenen Jods vom pH (in Abwesenheit eines Katalysators).

Man sieht, daß für einen sehr großen pH-Bereich, nämlich von
pH 2,35 bis pH 6,88, die ausgeschiedene Jodmenge nahezu unabhängig Siehe Tab. 22
vom pH ist; trotz über 30000fach größerer Wasserstoff-ionen-konzentration ist im Versuch bei pH 2,35 nur etwa 6% mehr Jod ausgeschieden worden als in dem bei pH 6,88. Wenn man annimmt, daß die Jodwasserstoff-konzentration nicht einfach auf einer Entladung der

[220]) k ist nämlich nach W. Nernst u. C. Hohmann, Ph. Ch. **11**, 375 (1893) bei dimolekularen Reaktionen umgekehrt proportional dem Volumen des Reaktionsgemisches.

Jod-ionen, sondern auf einer Dehydrierung von in sehr kleiner Menge vorhandenem, undissoziiertem Jodwasserstoff beruht, so wäre eine sehr beträchtliche Zunahme der Reaktionsgeschwindigkeit mit sinkendem pH zu erwarten, denn bei pH 2,35 müßte nach dem Massenwirkungsgesetz die Konzentration des undissoziierten Jod-wasserstoffs [221]) über 30000fach größer sein als bei pH 6,88. Es läßt sich also die weitgehende pH-Unabhängigkeit der Geschwindigkeit der Jodwasserstoffoxydation durch Hydroperoxyd nicht ohne weiteres mit der Dehydrierungstheorie in Einklang bringen, was wohl vor allem daran liegt, daß bisher die Dehydrierungstheorie noch nicht die Fälle, in denen der Wasserstoff elektrolytisch abdissoziiert ist, mit in den Kreis ihrer Betrachtungen hineingezogen wird, was deswegen nicht sonderlich dringlich war, da die Dehydrierungstheorie sich hauptsächlich mit den Oxydationsvorgängen bei organischen Substraten befaßt hat.



Figur 11.
pH-Kurve der „Na_2HPO_4-hämin"-peroxydasewirkung.

Wenn das pH über den Neutralpunkt ansteigt, so nimmt die Menge des in der Leerreaktion in Freiheit gesetzten Jods erst langsam, dann aber sehr schnell ab; bei pH 7,30 ist die ausgeschiedene Jodmenge noch 85% derjenigen, die man beim Versuch bei pH 6,88 erhält, bei pH 7,93 aber nur noch 7%. Bei höherer Acidität als pH 2,35 nimmt die ausgeschiedene Jodmenge erheblich mit sinkendem pH zu, bei pH 2,12 ist

[221]) Die Absolutkonzentration an undissoziierten Jodwasserstoffmolekeln wäre wahrscheinlich bei einer starken Säure, wie dem Jodwasserstoff, äußerst klein, nach den neueren Anschauungen von P. Debye u. E. Hückel (Physikal. Zeitschr. **24**, 185 u. 305, 1923) sogar völlig vernachlässigbar.

die ausgeschiedene Jodmenge um ca. 10% größer als bei pH 2,35 und es mag sein, daß im Bereich größerer Acidäten die von A. A. Noyes und A. Scott[222]) gefundene Proportionalität zwischen Reaktionsgeschwindigkeit und Wasserstoff-ionen-konzentration besteht. In dem Bereich geringer Acidäten und in mit Phosphatgemischen gepufferten Lösungen, mit denen ich gearbeitet habe, besteht diese Beziehung nicht, sondern zwischen pH 2,35 und pH 6,88 ist die Reaktionsgeschwindigkeit der unkatalysierten Reaktion weitgehend unabhängig von der Wasserstoff-ionenkonzentration.

Ganz anders liegen die Verhältnisse bei der durch Hämin katalysierten Reaktion; es ergibt sich bei ihr, wie aus dem Kurvenzug 2 der Figur 11 zu ersehen ist, für die ausgeschiedene Jodmenge ein deut- Siehe Tab. 23
liches Maximum zwischen pH 5 und pH 6. Noch klarer tritt das zutage, wenn man von den Werten, die man für die katalysierte Reaktion erhält, jeweils die zugehörigen Werte der Leerreaktion abzieht. Man erhält dann den Kurvenzug 3 der Figur 11 (S. 92), der direkt als ein Ausdruck der Abhängigkeit der peroxydatischen Leistungsfähigkeit des Hämins vom pH anzusehen ist. Ich vermute, daß die Tatsache eines Wirkungsmaximums bei pH 5 bis pH 6 dadurch zu erklären ist, daß sich zwei entgegengesetzte Einflüsse überlagern; der Wirksamkeitsanstieg mit steigender Wasserstoff-ionenkonzentration wird allmählich durch die stärkere Katalysatorschädigung bei niedrigerem pH kompensiert. Einen Anhalt für diese Annahme bietet die durch Figur 12 dargestellte Abhängigkeit der pH-Kurve von der Reaktionsdauer.

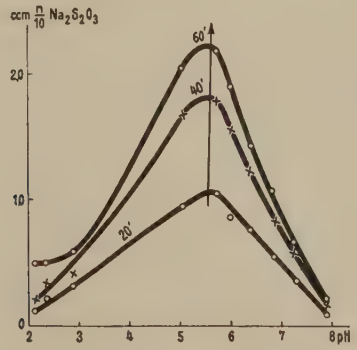
Die einzelnen Kurvenzüge geben die Differenzen der ausgeschiedenen Jodmenge im Katalysatorversuch und im dazugehörigen Leerversuch zu den angegebenen Zeiten wieder. Man sieht, wie bei kürzerer Reaktionsdauer das Maximum mehr im Sauren liegt, während es sich bei längerer Versuchsdauer ein wenig nach dem Alkalischen hin verschiebt. Wahrscheinlich beruht die Katalysatorschädigung durch steigende Wasserstoff-ionen-konzentration auf kolloid-chemischen Vorgängen. Läßt man das Reaktionsgemisch (ohne H_2O_2) 24 Stunden stehen, so ist in den Versuchen mit pH $\leq$ 4,46 alles Hämin ausgeflockt (wahrscheinlich als Hämatin), während bei pH 5,06 eine teilweise, bei pH 5,72 nur eine geringfügige Flockung statt hat; in den Lösungen mit höherem pH erfolgt keine Flockung. Wichtig ist es aber, daß auch in den sauersten Lösungen während der einstündigen Reaktionsdauer nur eine ganz geringfügige Trübung zu bemerken ist, die sich selbst mit Hilfe von Kollodium-ultrafiltern nicht filtrieren läßt. Aus dem zeitlichen Verlauf der peroxydatischen Häminwirkung irgendwelche Schlüsse zu ziehen — evtl.

---

[222]) Ph. Ch. **18**, 127 (1895).

Reaktionskonstanten zu berechnen — ist nicht angängig, da infolge der verschiedenen nebeneinander verlaufenden Reaktionen, die sich teilweise stark gegenseitig beeinflussen, die Verhältnisse dazu viel zu kompliziert sind [223]).

Über den Einfluß des Alters der Häminlösungen auf ihre peroxydatische Wirksamkeit liegen keine speziellen Versuche vor; jedenfalls kann der Einfluß nur ein geringer sein, da die ersten Versuche mit einer frischbereiteten Häminlösung mit den später gemachten weitgehend übereinstimmten. Immerhin ist auch bei der peroxydatischen Häminwirkung, wenigstens beim pH-Optimum, ein geringfügiges Anwachsen der Wirkung mit dem Alter der Häminlösung unverkennbar, nur ist es infolge der größeren Bestimmungsfehler kaum zahlenmäßig ausdrückbar.



Figur 12.
Einfluß der Reaktionsdauer auf die pH-Kurve der Häminperoxydasewirkung.

Zur Bestimmung des Temperaturkoeffizienten der Häminper-
Siehe Tab. 24 oxydasewirkung habe ich sowohl die Leerreaktion als auch die katalysierte Reaktion auch bei 10° und 20° untersucht (pH 5,72). Die Leerreaktion hat den üblichen Temperaturkoeffizienten, durch den bei 10° Temperaturerhöhung die Reaktionsgeschwindigkeit etwas mehr als verdoppelt wird. Der Einfluß der Temperaturerhöhung auf die Hämin-
Siehe Tab. 24a wirkung ist ein anderer; bei der Erhöhung von 0° auf 10° ist bei kurzer Reaktionsdauer (10 Min.) eine beträchtliche Wirksamkeitssteigerung (ca. 70%) zu beobachten, während bei längerer Reaktionsdauer (30 Min.) die Umsätze in beiden Fällen nur noch gleich groß sind. Bei 20° ist

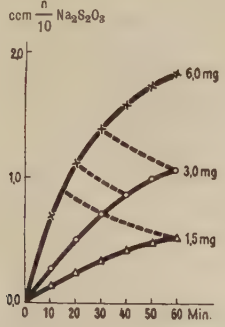
[223]) Siehe auch S. 7.

die peroxydatische Wirkung des Hämins fast gänzlich erloschen, bei höheren Temperaturen erleidet das Hämin also eine sehr starke Schädigung, die bewirkt, daß oberhalb 10° der Temperaturkoeffizient der peroxydatischen Häminwirkung negativ ist. Das Wirkungsoptimum liegt zwischen 0° und 10°, ist aber weitgehend von der Reaktionsdauer abhängig; je kürzer die Reaktionsdauer, desto höher die optimale Temperatur.

Wenn man das Reaktionsvolumen des Häminperoxydaseversuches halbiert (bei pH 5,72), so verdoppelt man dadurch die Geschwindigkeit der Leerreaktion und auch die der katalysierten Reaktion, wenigstens bei kurzen Reaktionszeiten (10 Min.). Bei längerer Versuchsdauer (30 Min.) beträgt die Differenz zwischen Haupt- und Leerversuch bei halbem Reaktionsvolumen nicht mehr 200%, sondern nur noch 180% derjenigen des üblichen Versuchs, wahrscheinlich infolge stärkerer Katalysatorschädigung durch die höhere Hydroperoxyd-konzentration.

Siehe Tab. 21

Siehe Tab. 25



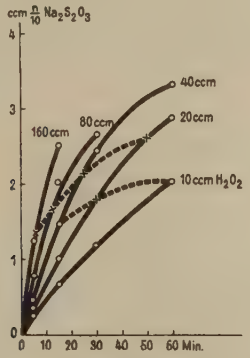
Figur 13.
Die Peroxydasewirkung des „Na_2HPO_4-hämins" in Abhängigkeit von der Häminmenge.

Figur 13 gibt die Abhängigkeit der Mehrausscheidung von Jod in der katalysierten Reaktion gegenüber der Leerreaktion von der Menge des angewandten Hämins wieder (pH 6,88). Man sieht, daß die mehr ausgeschiedene Jodmenge annähernd proportional der angewandten Häminmenge ist. Die gestrichelten Kurven, die Punkte, bei denen das Produkt Katalysatormenge × Reaktionszeit konstant ist, verbinden, weisen nach abwärts, d. h. in dem kürzer dauernden der beiden Versuche ist der Umsatz größer — ein Beweis für die allmähliche Schädigung des Katalysators auch bei den peroxydatischen Wirkungen des Hämins.

Siehe Tab. 26

Siehe Tab. 27

Figur 14 gibt bei pH 5,72 den Einfluß der Hydroperoxydmenge auf die peroxydatische Wirksamkeit des Hämins (Differenz von Haupt- und Leerversuch) wieder. Es ergibt sich keine Proportionalität zwischen der im Katalysatorversuch mehr ausgeschiedenen Jodmenge und dem angewandten Hydroperoxyd, wenn auch wenigstens bei kurzer Reaktionsdauer und nicht allzu großer Hydroperoxydkonzentratiom eine Vergrößerung der Hydroperoxydkonzentration auch eine ungefähr halb so große Erhöhung der ausgeschiedenen Jodmenge bewirkt. Ich glaube, daß die Nichtproportionalität vor allem auf die katalysatorschädigende Wirkung der größeren Hydroperoxydkonzentration zurückzuführen ist. Daß sich aber in diesem Fall die Einwirkung zweier

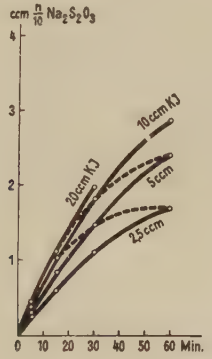


Figur 14.
Die „Na_2HPO_4-hämin"-peroxydasewirkung in Abhängigkeit von der angewandten H_2O_2-Menge.

schädigender Momente, große Hydroperoxydkonzentration und lange Reaktionsdauer überlagern, wovon die Schädigung durch größere Hydroperoxydkonzentration von stärkerem Einfluß ist, darauf weist die Tatsache dahin, daß die Gabeln, die Punkte verbinden, für die das Produkt Hydroperoxydmenge × Reaktionsdauer konstant ist, zwar alle nach aufwärts zeigen, d. h. bei demjenigen von zwei Versuchen, bei dem die Hydroperoxydkonzentration geringer ist, wird der größere Umsatz erzielt; mit zunehmender Reaktionsdauer wird aber die Neigung der Gabel immer flacher — allmählich macht sich eben auch der Einfluß der Schä-
Siehe Tab. 27 (letzte Spalte)
digung durch die längere Reaktionsdauer geltend. Besonders kraß macht sich das bei dem Stundenwert des mit 160 ccm H_2O_2 angestellten

Versuchs geltend; daß der Stundenwert aber geringer ist als der Halbstundenwert, ist nur aus reaktionskinetischen Gründen (Verarmung an Hydroperoxyd im Katalysatorversuch) erklärbar.

Figur 15 gibt ebenfalls bei pH 5,72 den Einfluß der Jod-ionenkonzentration auf die Wirksamkeit des Hämins wieder. Es ist die im Katalysatorversuch mehr ausgeschiedene Jodmenge nur in geringem Maße von der Jod-ionen-konzentration abhängig (im Gegegensatz zur Leerreaktion!). Es weisen daher auch bei Figur 15 die Gabeln stark nach aufwärts — d. h. von zwei Versuchen, bei denen das Produkt Jod-ionenmenge × Reaktionszeit konstant ist, wird in dem mit längerer Reaktionsdauer auch der größere Umsatz erzielt. Siehe Tab. 28

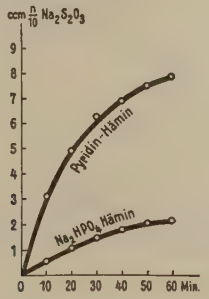


Figur 15.
Die Na_2HPO_4-peroxydasewirkung in Abhängigkeit von der Jod-ionen-konzentration.

Da sich aber in Sonderversuchen weder Jod-ionen noch freies Jod als das Hämin schädigend erwiesen haben (übrigens kann ja die Konzentration an freiem Jod nie beträchtlich werden, da in allen Versuchen fortlaufend mit $Na_2S_2O_3$ titriert wurde), so ist das geringe Ansteigen der Katalysatorwirkung mit steigender Jod-ionen-konzentration wohl kaum auf eine Katalysatorschädigung zurückzuführen. Wahrscheinlich ist die richtige Deutung die, daß der vor allem die Reaktionsgeschwindigkeit bedingende Vorgang die Aktivierung des Hydroperoxyds am Hämin ist, während sich die Jod-ionen-entladung dann mit beträchtlich größerer Reaktionsgeschwindigkeit vollzieht, weswegen nur bei geringer Jod-ionen-konzentration diese einen erheblichen Einfluß

auf die Reaktionsgeschwindigkeit ausübt. Beim Oxyhämoglobin, wo diese Erscheinung noch ausgesprochener zutage tritt, werde ich dann auf ihre Bedeutung für die Annahmen über den wahrscheinlichen Reaktionsverlauf eingehen.

Über den Einfluß, den Neutralsalze auf die peroxydatische Häminwirkung ausüben, habe ich mich nur durch ganz wenige Versuche unterrichtet. Bei pH 5,72 wird die Leerreaktion durch zugesetztes Natriumchlorid gar nicht beeinflußt, während die Katalysatorwirkung eine Steigerung erfährt (ca. 20%); merkwürdig ist nur, daß diese Wirkung des Natriumchlorids unabhängig von der angwandten Natriumchloridkonzentration zu sein scheint, denn man erhält die etwa 20%ige Wirksam-
Siehe Tab. 29 keitssteigerung sowohl wenn das Reaktionsgemisch 0,125% NaCl, als
Siehe Tab. 22 u. 23 auch wenn es 1,25% NaCl enthält. Sowohl die Leerreaktion, wie die Katalysatorwirkung erfährt eine Erhöhung, wenn man anstatt Phosphatpuffer gleichkonzentrierte Acetatpuffer verwendet; daher passen die mit Acetatpuffer gefundenen Werte dem Absolutwert nach nicht in die pH-Kurve der Häminwirkung hinein, wenn auch die Richtung des mit Acetatpuffer ermittelten Stückes der pH-Kurve sich mit der durch Interpolation aus anderen Phosphatwerten sich ergebenden Richtung



Figur 16.
„Pyridin-hämin" und „Na_2HPO_4-hämin" als Peroxydasen.

deckt. (Die Gleichheit der Differentialquotienten beruht auf der pH-Unabhängigkeit der Acetat-ionen-wirkung, die infolgedessen bei der pH-Kurve nur eine rein additive Größe wird.)

Durch den Zusatz einer solchen Menge von Kaliumpyro-phosphat (10 mg) oder Cyankalium (5 mg), daß auf 1 Molekül Katalysator ca. 6
Siehe Tab. 30 ($K_4P_2O_7$) bzw. ca. 16 (KCN) Moleküle zugesetzten Stoffes kommen, ist die Häminperoxydase-wirkung nicht vergiftbar. Zu dem mit KCN ver-

setzten Versuch ist zu bemerken, daß seine Titration infolge schlechter Erkennbarkeit des Umschlagspunktes schwierig ist; die Unschärfe des Umschlagspunktes beruht wahrscheinlich auf Jod-cyan-bildung.

Die peroxydatischen Wirkungen des „Pyridin-hämins" im Vergleich zu denen des „Na_2HPO_4-hämins" werden durch Figur 16 veranschaulicht; die eine Kurve gibt beim „Pyridin-hämin", die andere beim „Na_2HPO_4-hämin" die Differenzen zwischen Katalysator und Leerversuch wieder (alle Versuche bei pH 5,72). Die peroxydatische Wirksamkeit des „Pyridin-hämins" ist, wie man sieht, fast fünfmal so groß wie die des „Na_2HPO_4-hämins" (der Leerversuch zum „Pyridin-hämin"-versuch enthielt dieselbe Pyridinmenge wie der dazugehörige Hauptversuch, die aber keinen Einfluß auf die Geschwindigkeit der Jodausscheidung hat). Siehe Tab. 31

5. Gleichzeitige katalatische und peroxydatische Wirkung des Hämins.

Um mich darüber zu unterrichten, ob Hämin, das die Jodwasserstoff-oxydation durch Hydroperoxyd beschleunigt, gleichzeitig im selben Maße katalatisch wirkt, wie in Abwesenheit von Kaliumjodid, habe ich folgenden Versuch angestellt:

Bei pH 5,72 (ich wählte dieses pH, weil dann infolge der beträchtlichen Acidität die Katalasewirkung des Jod-ions so klein ist, daß sie vernachlässigt werden kann) habe ich einen gewöhnlichen Peroxydaseversuch nach Ablauf der einstündigen Reaktionsdauer mit Thiosulfat titriert, dann mit verdünnter Schwefelsäure angesäuert, mit einem Überschuß von Jod-kalium versetzt und gleichzeitig noch Molybdänsäure zugefügt (als Katalysator der bei niedriger Temperatur auch in stark saurem Gebiet langsam verlaufenden Umsetzung zwischen Hydroperoxyd und Jodwasserstoff); das ausgeschiedene Jod diente als Maß des gesamten nach einer Stunde noch vorhandenen Hydroperoxyds. Die katalatische Wirkung des Hämins ist nur 50% derjenigen in den Versuchen ohne Kaliumjodid. Man kann dies natürlich als eine spezifische Hemmung der Häminkatalase durch Kaliumjodid ansehen; eine andere, mir wahrscheinlicher erscheinende Deutung wäre folgende: Die peroxydatisch aktivierte H_2O_2-Menge (berechnet aus der Differenz von Katalysator- und Leerversuch) ist 26% der im Katalaseversuch ohne KJ zersetzten Hydroperoxydmenge. Die Gesamtmenge des aktivierten Hydroperoxyds wäre also demnach 76% von der im Versuch ohne KJ oder, wenn man annimmt, daß bei der Katalasewirkung des Hämins nur die Hälfte des Hydroperoxyds aktiviert wird (die andere Hälfte wird dann durch das aktivierte Hydroperoxyd zu Sauerstoff oxydiert), Siehe Tab. 32

sogar 102%. Es würde sich bei dieser letzten Annahme die Menge des durch Hämin aktivierten Hydroperoxyds innerhalb der unvermeidlichen analytischen Fehler als durch den KJ-Zusatz unbeeinflußt erweisen; es würde im Katalaseversuch alles aktivierte Hydroperoxyd zu Hydroperoxyd-oxydation verbraucht werden, im Peroxydaseversuch teils zur Jodwasserstoff-oxydation, teils zur Hydroperoxyd-oxydation. So verlockend wie diese Deutung ist[224]), so halte ich die Verhältnisse für so kompliziert, daß ich nicht für die unbedingte Richtigkeit dieser Deutung einstehen kann. Es könnte der Rückgang der aktivierten Hydroperoxydmenge auf 76% sehr wohl auf einer spezifischen Hemmung durch KJ beruhen. Dann ist auch der bei dieser Deutung anzunehmende dimolekulare Verlauf der Katalasewirkung des Hämins schwer vereinbar mit dem Befund, daß diese Reaktion unabhängig vom Reaktionsvolumen ist. Hilfshypothesen, wie die Annahme, daß es sich bei der Häminkatalase um eine Stufenreaktion mit mehreren Reaktionsstufen von sehr ungleicher Geschwindigkeit handelt, wovon die langsamste Reaktion monomolekular sei, die schnellere (dimolekulare Reaktion) aber von einer, mit der Jodwasserstoffoxydation durch aktiviertes Hydroperoxyd kommensurablen Geschwindigkeit, sind durch keine experimentellen Tatsachen gestützt, noch weniger die Annahme, daß die Unabhängigkeit der Häminkatalasewirkung vom Reaktionsvolumen eine zufällige sei, bedingt durch eine Katalysatorschädigung die den geschwindigkeitserhöhenden Einfluß des geringeren Reaktionsvolumens, der sich bei einer dimolekularen Reaktion ergeben müßte, gerade kompensiert. Nur eine sehr umfangreiche experimentelle Untersuchung könnte die Entscheidung in dieser schwierigen Frage bringen.

6. Die Schädigung des Hämins.

Schon sehr oft war von der Schädigung, die das Hämin durch das Hydroperoxyd erleidet, die Rede; es waren immer Schlußfolgerungen aus der Reaktionskinetik, die zu ihrer Annahme führten. In einigen Versuchen habe ich die Schädigung des Katalysators direkt festgestellt und kann damit auch ein quantitatives Maß dieser Schädigung angeben. In einem Hämin-katalaseversuch (bei pH 5,72), der im Gegensatz zu

---

[224]) Wie auf S. 8 ausgeführt, wäre es nicht zulässig, aus der Verschiedenheit der Wärmetönungen der beiden Reaktionen zu schließen, daß die Reaktionsgeschwindigkeit der Reaktion mit größerer Wärmetönung größer sei, und daß daher die Reaktion mit geringerer Wärmetönung nur in untergeordnetem Maße gleichzeitig verlaufen könnte; es besteht eben keine Beziehung zwischen der Reaktionsgeschwindigkeit und der Wärmetönung einer Reaktion.

den üblichen Versuchen (200 ccm Reaktionsvolumen) nur ein Reaktionsvolumen von 190 ccm hatte, wurde nach einer Stunde, wie in den Peroxydaseversuchen üblich, 10 ccm 0,42n KJ zugegeben; in einem Parallelversuch wurde festgestellt, daß vor Zugabe des KJ 25,3% des H_2O_2 katalatisch zersetzt worden waren; ferner wurde ein Peroxydaseversuch angesetzt, der sich in nichts von den üblichen Peroxydaseversuchen unterschied, außer, daß er nur 74,7% der üblichen Hydroperoxydmenge enthielt (statt 20 ccm H_2O_2 nur 14,94 ccm H_2O_2 und 5,06 ccm Wasser). Die gegenüber dem ebenfalls angesetzten Leerversuch mit nur 74,7% des üblichen H_2O_2-Gehalts mehr frei gemachte Jodmenge war in dem nicht mit Hydroperoxyd vorbehandelten Versuch um 13% größer als in dem vorbehandelten Versuch. Da die beiden Versuche, außer in ihrer Vorgeschichte, völlig miteinander übereinstimmten, so ist es zulässig, zu sagen, daß durch einstündiges Einwirken der in den Versuchen gewöhnlich angewandten Hydroperoxydmenge bei 0° das Hämin 13% seiner peroxydatischen Wirksamkeit verliert. Da dieses Ergebnis in guter Übereinstimmung mit den aus den kinetischen Messungen gezogenen Schlußfolgerungen steht[225]), so kommt ihm wohl trotz der in dieselbe Größenordnung fallenden Versuchsfehler reelle Bedeutung zu. Siehe Tab. 33

Um die schädigende Wirkung des Hydroperoxyds auf die katalatische Wirksamkeit des Hämins zu bestimmen, wurden folgende, etwas andersgeartete Versuche gemacht:

Der Häminkataläseversuch (bei pH 7,92) wurde 50 Stunden lang im schmelzenden Eis stehen gelassen; hernach waren 78,4% des angewandten Hydroperoxyds zersetzt, der Katalysator war weitgehendst verblaßt, neu zugesetztes Hydroperoxyd konnte er nicht mehr zersetzen; die Reaktion war infolge völliger Inaktivierung des Katalysators zum Stillstand gekommen, nicht etwa, weil ein Gleichgewicht erreicht war[226]). Ließ man den Versuch nicht bei 0°, sondern im Thermostaten bei 20° 50 Stunden lang stehen, so war der Stillstand schon früher eingetreten, nämlich, nachdem 54,9% des angewandten Hydroperoxyds zersetzt worden war. In diesem Fall war die Farbe des Katalysators völlig verschwunden; ebenfalls wurde neu zugesetztes Hydroperoxyd nicht zersetzt. Genau gleichartige Versuche habe ich auch mit „Pyridin-hämin" bei pH 5,72 gemacht. Sowohl bei 0° als auch bei 20° war nach 50 Stunden die Gesamtmenge des Hydroperoxyds zersetzt; in dem bei 0° ausgeführten Versuch konnte das Hämin noch neu zugesetztes Hydroperoxyd zersetzen, und zwar mit einer ungefähr 40% so großen Geschwindigkeit wie nichtvorbehandeltes Hämin; in Siehe Tab. 33a

[225]) Siehe auch S. 69.
[226]) Siehe S. 8.

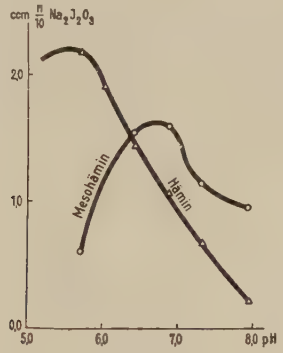
dem bei 20° ausgeführten Versuch war die Geschwindigkeit, mit der neu zugegebenes Hydroperoxyd zersetzt wurde, sehr klein, höchstens 2% von der Geschwindigkeit bei Verwendung von unvorbehandeltem Hämin. In beiden Versuchen war das Hämin infolge des geringen pH des Versuchsansatzes und der langen Versuchsdauer (50 Stunden) ausgeflockt; in dem bei 20° ausgeführten Versuch außerdem stark verblaßt; vor dem Zusatz des neuen Hydroperoxyds wurde das ausgeflockte Hämin durch kräftigeres Umschütteln suspendiert. Auch diese Versuche zeigen deutlich die Schädigung des Hämins durch das Hydroperoxyd, und vor allem auch die Verstärkung der Schädigung durch die Erhöhung der Temperatur, außerdem aber auch die weitaus größere katalatische Leistungsfähigkeit des „Pyridin-hämins" gegenüber dem „Na_2HPO_4-hämin".

7. Der Vergleich des Hämins mit anderen Katalysatoren.

Die zahlreichen, hier beschriebenen Versuche über die katalatischen und peroxydatischen Eigenschaften des Hämins haben gezeigt, in wie hohem Maß diese Eigenschaften durch die Variation fast einer jeden der zahlreichen variablen Versuchsbedingungen beeinflußt werden. Da es nun wegen der großen Zahl gleichzeitiger, nicht ausschaltbarer Einflüsse unmöglich ist, einfache Gesetzmäßigkeiten der Abhängigkeit der katalatischen bzw. der peroxydatischen Wirksamkeit eines Katalysators von den Versuchsbedingungen aufzustellen, so ist ein Vergleich zweier verschiedener Katalysatoren nur so möglich, daß man ihre Leistungsfähigkeit bei denselben, willkürlich gewählten Versuchsbedingungen miteinander vergleicht. Es läßt sich eine solche Gegenüberstellung dadurch ausbauen, daß man die Zahl der Einzelvergleiche (jeweils unter denselben, willkürlichen Versuchsbedingungen) vergrößert. Man muß sich darüber klar sein, daß zur vollständigen Charakteristik des Verhältnisses der katalytischen Leistungsfähigkeit zweier Katalysatoren eine sehr große Zahl von Einzelvergleichen notwendig ist. Bei keinem der andern untersuchten Katalysatoren konnte ich eine ähnlich große Zahl von Versuchen ausführen wie beim Hämin, trotzdem habe ich mich natürlich bemüht, das Ergebnis eines Vergleichs zweier Katalysatoren von zufälligen Momenten möglichst zu befreien. So habe ich vor allem für die meisten anderen untersuchten Blutfarbstoffderivate eine pH-Kurve der peroxydatischen Wirksamkeit aufgenommen, weil sich der Einfluß des pH auf die peroxydatische Wirksamkeit als sehr erheblich und vor allem auch als spezifisch und geeignet zur Unterscheidung zweier Katalysatoren erwies. Beim Vergleich der katalytischen Wir-

kungen habe ich vor allem auch die Wirksamkeit der in Pyridin gelösten Katalysatoren herangezogen. Die Versuchsansätze waren sowohl bei den peroxydatischen, als auch bei den katalatischen Versuchen mit anderen Katalysatoren dieselben, wie ich sie beim Hämin beschrieben habe[227]), da die dort gewählten Versuchsbedingungen sich als recht geeignet erwiesen hatten.

Figur 17 gibt einen Vergleich der pH-Abhängigkeit der peroxydatischen Wirksamkeit von Hämin und Meso-hämin wieder (Stundenwerte der Differenz zwischen Katalysator- und Leerversuch). Das Mesohämin wurde nach der Vorschrift von J. Zaleski[228]) aus Meso-porphyrin, in das das Eisen mit Hilfe von Ferro-acetat eingeführt wird,



Figur 17.
„Na_2HPO_4-hämin“ und
„Na_2HPO_4-mesohämin“.

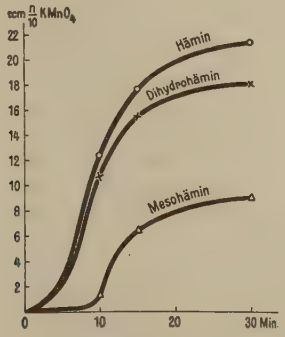
dargestellt. Es wurden verschiedene Präparate von Meso-hämin miteinander verglichen und als untereinander gleich befunden. Unter anderem wurde auch ein sehr reines Meso-hämin-präparat zum Vergleich mit herangezogen, für dessen Überlassung ich Herrn Geheimrat Professor Dr. Hans Fischer zu bestem Dank verpflichtet bin. Die Auflösung des Meso-hämins erfolgte, ebenso wie beim Hämin, in $\frac{m}{50}$ Na_2HPO_4, in dem sich aber das Meso-hämin wesentlich schwerer löst als Hämin; daher ist auch die Katalysatorlösung, die durch halb-

[227]) Siehe S. 66/67 und S. 89/90.
[228]) H. **53**, 11 (1904/05).

stündiges Kochen des eingewogenen Mesohämins mit der $\frac{m}{50}$ Na_2HPO_4-Lösung dargestellt worden war, etwas trüb; vor dem Herauspipettieren habe ich sie immer kräftig umgeschüttelt. Der Versuchsansatz blieb dann lange über die einstündige Versuchsdauer hinaus klar.

Siehe Tab. 34 und Tab. 23

Es kommt, wie aus der Figur zu ersehen ist, beim pH-Optimum des Hämins (ca. 5,72) dem Meso-hämin kaum ein Viertel der Häminwirkung zu, während beim pH-Optimum des Meso-hämins (ca. pH 6,8) das Meso-hämin ungefähr um 50% wirksamer ist als das Hämin. Die Form beider pH-Kurven (vor allem wenn man den in dieser Figur fehlenden Teil der Häminkurve in stärker saurem Gebiet hinzu nimmt) ist einander ähnlich, nur ist bei Meso-hämin das pH-Optimum um etwas mehr als eine pH-Einheit nach rechts verschoben, und die absolute Höhe des Maximums ist um ca. 30% geringer. Beachtenswert ist, daß das Meso-hämin bei pH 7,3 und pH 7,93 vom Hydroperoxyd weit stärker angegriffen wird als Hämin, was sich dadurch zu erkennen gibt, daß im Versuch bei pH 7,3 in der einstündigen Versuchsdauer eine weitgehende Verblassung der Meso-häminfarbe zu beobachten ist, bei pH 7,93 sogar eine völlige Entfärbung.



Figur 18.
Hämin, Dihydro-hämin und Meso-hämin als Katalasen (wäßriges Medium).

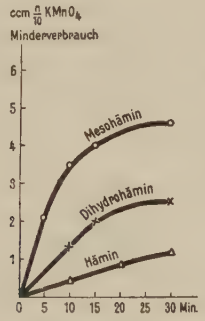
Die katalatische Wirksamkeit von in Na_2HPO_4 gelöstem Mesohämin ist entweder gleich Null oder so klein, daß sie innerhalb der analytischen Versuchsfehler fällt, mindestens aber mehr als zehnmal kleiner als die des „Na_2HPO_4-hämins".

Siehe Tab. 35

Einen Vergleich der katalatischen Wirksamkeit von in 2,5%igem Pyridin gelöstem Hämin, Meso-hämin und Dihydro-hämin bei pH 5,72

gibt Figur 18. Das Dihydro-hämin ist, wie ja schon früher ausführlich dargelegt wurde, bei der katalatischen Hydrierung des Hämins entdeckt worden; die katalatische Hydrierung des Hämins wurde versucht, um eine bequeme Darstellungsweise für das Meso-hämin aufzufinden. Man sieht aus den Kurven der Figur 18 folgendes: Unter den angegebenen Bedingungen ist Dihydrohämin um knapp 15% weniger wirksam als Hämin, während das Meso-hämin eine sehr viel kleinere Wirksamkeit hat. Besonders auffallend an der Meso-hämin-kurve ist, daß in den ersten 10 Minuten die Hydroperoxyd-zersetzung durch das Meso-hämin äußerst klein ist, später dann aber wesentlich schneller erfolgt. Diese Inkubationsdauer von fast 10 Minuten deutet darauf hin, daß vielleicht das Meso-hämin auch unter diesen Bedingungen katalatisch unwirksam ist, daß es aber innerhalb 10 Minuten durch das Hydroperoxyd so verändert wird, daß es dann katalatisch wirkt.

Ganz anders liegen die Verhältnisse bei dem in 75%igem Pyridin gemachten Versuche.



Figur 19.
Hämin, Dihydro-hämin und Meso-hämin als Katalasen (75%iges Pyridin).

Figur 19 zeigt die Verhältnisse bei Anwendung von 0,6 mg Katalysator. Unter diesen Bedingungen ist Meso-hämin der bei weitem wirksamere Katalysator der Hydroperoxydzersetzung als Dihydro-hämin und Hämin; das Dihydro-hämin steht etwa in der Mitte zwischen Meso-hämin und Hämin, während das Hämin kaum $^1/_6$ der Wirksamkeit des Meso-hämins besitzt. Es ist dies ein überzeugendes Beispiel dafür, von wie großem Einfluß die Reaktionsbedingungen sind. Die Reihen-

Siehe Tab. 36

folge der Wirksamkeit der drei miteinander verglichenen Katalysatoren ist in wässerigem Medium gerade die umgekehrte, wie in 75%igem Pyridin. Folgende Zusammenstellung verdeutlicht am besten die völlige Verschiedenheit der relativen Wirksamkeiten in wässerigem Medium und in 75%igem Pyridin. Die Wirksamkeit von Hämin ist in beiden Fällen gleich 100 gesetzt.

	Hämin	Dihydrohämin	Mesohämin	„Perhydrohämin"
wässeriges Medium	100	85	43	—
75% Pyridin	100	314	606	0,1

Siehe Tab. 36a

Wenn man für die Versuche in 75%igem Pyridin nicht 0,6 mg Katalysator, sondern 1,8 mg Katalysator verwendet, so wird dadurch in dem Verhältnis Hämin, Dihydro-hämin und Meso-hämin nichts geändert; da aber beim Meso-hämin und Dihydro-hämin bei Anwendung von 1,8 mg schon in den ersten 5 Minuten der Reaktion der größte Teil des Hydroperoxyds zersetzt wird[229]), so sind die Unterschiede der Wirksamkeit aus reaktionskinetischen Gründen nicht so deutlich, wie wenn man nur 0,6 mg verwendet. Wenn man unter denselben Versuchsbedingungen 1,8 mg „Perhydrohämin" als Katalysator der Hydroperoxydzersetzung verwendet, so ist die zersetzte Hydroperoxydmenge so geringfügig, daß sie innerhalb der analytischen Fehler liegt; „Perhydrohämin" hat also entweder gar keine katalatischen Wirkungen oder nur äußerst geringe.

Trotzdem alle Hämine unabhängig von der Herkunft des Blutes und der Darstellungsweise des Hämins in ihrer prozentualen Zusammensetzung völlig mitneinander übereinstimmen[230]), so bestehen doch Unterschiede zwischen verschiedenen Häminen — eine Isomerieerscheinung, die wahrscheinlich auf Unterschiede in der Art der Betainbildung zwischen den Carboxylgruppen und den Pyrrolstickstoffen beruht. W. Küster[231]) teilt die Hämine gemäß ihrer Darstellungsweise in zwei Kategorien ein[232]), die nach M. Schalfejeffs Methode[233]) (Eis-

[229]) In 75%er Pyridinlösung besteht übrigens auch beim Dihydrohämin ebenso wie beim Hämin (s. S. 88) keine Proportionalität zwischen Katalysatormenge und zersetzter Hydroperoxydmenge. So erhöht sich auch beim Dihydrohämin die Wirksamkeit mit zunehmendem Quotienten Dihydrohämin-menge : Hydroperoxydmenge; beim Mesohämin ist wenigstens angenähert eine Proportionalität zwischen Katalysatormenge und zersetzter Hydroperoxydmenge vorhanden.

[230]) W. Küster, H. **40**, 391 (1903/04).

[231]) W. Küster u. H. Reihling, H. **91**, 115 (1914) und W. Küster, H. **129**, 156 (1923).

[232]) Ein Eingehen auf weitere Einzelheiten der Einteilung, z. B. auf die in angesäuertem Alkohol löslichen Pseudohämine, würde hier zu weit führen.

[233]) B. **18c**, 232 (1885).

essigmethode) dargestellten Hämine bezeichnet er als α-Hämine, die nach K. Mörners Methode[234]) (Alkoholschwefelsäuremethode) dargestellten als β-Hämine. Die Unterscheidung der beiden Hämin-Typen erfolgte auf Grund ihrer verschiedenen Löslichkeiten, der Verschiedenheiten ihrer Methylierbarkeit mit Diazo-methan und der Verschiedenheiten in bezug auf Leitfähigkeit in Pyridinlösung. In seinen „Individuellen Blutuntersuchungen"[235]) hat dann W. Küster gezeigt, daß nicht nur Hämine verschiedener Darstellungsweise voneinander verschieden sind, sondern es können auch Hämine gleicher Darstellungsweise voneinander verschieden sein, was wohl darauf beruhen mag, daß das Blut mancher Tiere mehr zur Bildung von α-Häminen, das anderer Tiere mehr zur Bildung von β-Häminen neigt. Da nun die Möglichkeit bestand, daß die feinen Unterschiede, die zwischen verschiedenen Häminen bestehen, auch in einem verschiedenen katalytischen Wirkungsvermögen zum Ausdruck kommen, so habe ich Hämine aus Rinderblut (zweier verschiedener Tiere), Pferdeblut und Schweineblut nach Schalfejeff dargestellt[236]) und miteinander in bezug auf ihre katalatischen Wirksamkeiten verglichen. Es haben sich dabei innerhalb der Fehlergrenzen der Bestimmungsmethoden die katalatischen Wirksamkeiten der aus dem Blut verschiedener Tiere dargestellten Hämine bei allen Versuchsbedingungen[237]) als gleich erwiesen. Es beweist aber dies natürlich nicht, daß es nicht doch verschiedene Hämine geben kann; es läßt sich vorläufig nicht entscheiden, ob die Verschiedenheiten der prosthetischen Gruppen bei der Auflösung des Hämins, wofür ja leider nur alkalische Medien zur Verfügung stehen, vernichtet werden, oder ob so feine Unterschiede, wie sie W. Küster annimmt, die katalatische Wirksamkeit unbeeinflußt lassen[238]).

Siehe Tab. 37

[234]) Nordiskt Med. Arch., Festbd. Nr. 1, Nr. 26, 1 (1896).

[235]) W. Küster, A. Gerlach u. F. Schoder, H. **133**, 150 (1924); W. Küster u. H. Oesterlin, H. **136**, 279 (1924); W. Küster, H. **138**, 21 (1924).

[236]) Nach K. Mörner dargestellte Hämine habe ich nicht mit herangezogen, da sie, wie schon J. Hepter u. L. Marschlewski (H. **41**, 38, 1904) nachgewiesen haben, keine einheitlichen Stoffe sind, sondern Gemische von Hämin mit wechselnden Mengen Hämin-ester.

[237]) Hämin aus Schweineblut stimmt in Na_2HPO_4 gelöst ebenfalls gut mit den anderen Häminen überein; in 1,5%igem Pyridin gelöst, ist es bei pH 5,7 ca. 10% wirksamer als die andern Hämine. Ich glaube aber nicht, daß dieser Unterschied auf eine Verschiedenheit des Schweinehämins gegenüber den anderen Häminen zurückzuführen ist, sondern eher auf irgendeine, nicht genügend beachtete und in ihrer Wirkung nicht erkannte kleine Abweichung von der Norm, die mir vielleicht bei der Herstellung der Katalysatorlösung aus dem Schweinehämin unterlaufen ist.

[238]) Es besteht natürlich auch die Möglichkeit, daß zufälligerweise alle vier zum Vergleich herangezogenen Hämine demselben Hämintyp angehören. Es

Während also die Reduktion des Hämins zum Dihydro-hämin, Meso-hämin und „Perhydro-hämin" seine katalatischen Eigenschaften stark verändert, lassen sich Unterschiede zwischen verschiedenen Häminen durch die Untersuchung der katalatischen Wirkungen nicht auffinden. Auch der Austausch des Chlors im Hämin gegen Brom, Jod und Rhodan beeinflußt die katalatische Wirksamkeit nicht. Der Vergleich wurde bei pH 5,72 und mit 0,3 ccm einer $\frac{1}{65}$ m Lösung der

Siehe Tab. 38

Katalysatoren in reinem Pyridin durchgeführt[239]). Es wurde also die Verschiedenheit der Molekulargewichte bei der Einwage für die Katalysatorlösung berücksichtigt; dadurch war der Fe-Gehalt der Katalysatorlösung immer derselbe; wurde aus Versehen die Berücksichtigung des Molekulargewichtes einmal außer acht gelassen, so wurde durch Umrechnung der richtige Wert für die zersetzte Hydroperoxydmenge gefunden; da zwischen angewandter Katalysatormenge und zersetzter Hydroperoxydmenge nahezu Proportionalität vorhanden ist, so ist die Umrechnung sehr leicht durchzuführen. Bromhämin[240]) und Rhodanhämin[241]) wurden nach der Vorschrift von W. Küster dargestellt; diese ist eine Modifikation der Schalfejeffschen Methode; es wird der Eisessig anstatt mit NaCl mit NaBr bzw. KCNS unter Zusatz von freier Rhodanwasserstoffsäure gesättigt; Jodhämin, das zuerst unter den mikroskopischen Präparaten H. U. Koberts[242]) erwähnt wird, wurde durch Verwendung von mit KJ gesättigtem Eisessig dargestellt. Versuche, nach derselben Methode Cyanhämin darzustellen, mißlangen, trotzdem ich die Versuche in einem zugeschmolzenen Bombenrohr ausführte, damit die Blausäure nicht wegsieden kann; um ein Gerinnen des Blutes durch vorzeitiges Einwirken des noch kalten Eisessigs zu verhindern, war das Bombenrohr zweischenkelig; den einen Schenkel, in dem sich der Eisessig befand, hing ich in siedendes, mit $CaCl_2$ gesättigtes Wasser (110°), und kippte erst nach dem Heißwerden des Eisessigs aus dem andern Schenkel allmählich das Blut, dem ein großer Überschuß KCN beigemischt war, hinzu. Dann erhitzte ich das Gemisch noch 3 Stunden lang auf 100° bis 110°; auf diese Weise erfolgte eine völlig klare Auflösung des Blutes zu einer tief-

---

wäre notwendig, an Hand eines größeren Materials, das bestimmt Hämine beider Typen enthält, die hier angeschnittene Frage nochmals zu untersuchen.

Siehe Tab. 38a

[239]) Wenn man in 1,5%igem Pyridin gelöstes Chlor- und Bromhämin miteinander in bezug auf ihre katalatische Wirksamkeit vergleicht, so erweist sich Bromhämin erheblich wirksamer.

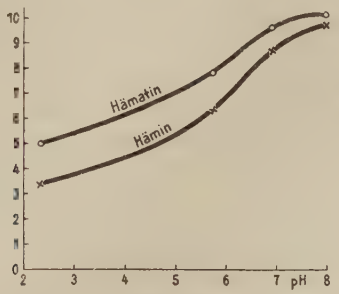
[240]) H. **91**, 115 (1914).

[241]) H. **129**, 156 (1923).

[242]) H. U. Kobert, „Das Wirbeltierblut in mikro-kristallographischer Hinsicht", Stuttgart 1901.

braunen Flüssigkeit, genau wie bei der Hämindarstellung. Beim Öffnen des Bombenrohres war noch deutlich der Geruch von Blausäure wahrzunehmen. Es erfolgte aber aus der klaren dunkelbraunen Lösung auch nach Wochen keine Auskristallisation. Proben versuchte ich durch Einengen, Impfen mit Häminkristallen, sukzessives Versetzen mit kleinen Mengen Wasser, zum Kristallisieren zu bringen; diese Versuche führten alle nicht zum Ziel; wurde der Wasserzusatz zu groß, so fiel amorphes Hämatin aus.

Auch Hämatin, bei dem das Chlor des Hämins gegen eine Hydroxylgruppe ausgetauscht ist, habe ich in bezug auf seine katalatische Wirksamkeit mit Hämin verglichen. Das Hämatin wurde durch Ausfällen einer $\frac{m}{650}$ Häminlösung in $\frac{m}{50}$ Na_2HPO_4 mit verdünnter Schwefelsäure dargestellt. Der Niederschlag wurde bis zum Verschwinden der Chlor-ionen-reaktion des Waschwassers ausgewaschen und dann wieder in heißem $\frac{m}{50}$ Na_2HPO_4 zu einer $\frac{m}{650}$ Hämatinlösung aufgelöst.



Figur 20.
„Na_2HPO_4-hämin“ und „Na_2HPO_4-hämatin“ als Katalasen.

Wie Figur 20 zeigt, ist Hämatin etwas wirksamer als Hämin unter denselben Bedingungen; man sieht aber auch deutlich, daß der Unterschied nur bei niedrigem pH beträchtlich ist, während mit zunehmender Alkalinität der Unterschied so gering wird wie die möglichen analytischen Fehler. Wahrscheinlich ist auch bei den Versuchen mit Hämin (wohl auch bei denen mit Brom-, Rhodan- und Jod-hämin) der wirksame Katalysator Hämatin[243]); höchstens bei den „Na_2HPO_4-hämin“- Siehe Tab. 39

[243]) Nach neueren Versuchen von R. Kuhn u. M. Furter (noch unveröffentlicht) ist diese Deutung wohl doch nicht ganz stichhaltig, wenigstens für die Pyridinlösung des Hämins. Inzwischen sind die Versuche von R. Kuhn und M. Furter erschienen, und zwar: B. **61**, 128, 1928; der Austausch des Chlors erfolgt demnach nicht so leicht, wie ich angenommen habe.

versuchen bei niedrigem pH liegt wohl noch ein Teil des Katalysators als Hämin vor; dieses ist wahrscheinlich weniger wirksam als Hämatin, wodurch die die Abweichungen zwischen Hämin und Hämatin bei niedrigem pH erklären. Auch die schon erwähnten, aber später noch näher zu besprechenden pCl-Messungen stehen mit dieser Ansicht in Übereinstimmung. Die Versuche mit Mono-methyl-chlor-hämin[244]) will ich nur ganz kurz erwähnen; in wässerigem Medium kommt der Verbindung keine peroxydatische Wirksamkeit zu, was aber wahrscheinlich auf ihrer völligen Unlöslichkeit in wässerigen Lösungen beruht. (Es wurde die Auflösung der Verbindung in Pyridin als Katalysator benutzt.) In 75%iger Pyridinlösung kommt dem Mono-methyl-chlor-hämin sehr beträchtliche katalatische Wirksamkeit zu (größer als die von Hämin), aber da die Verbindung, wie aus den kristallographischen Bestimmungen[245]) hervorgeht, nicht einheitlich ist, so ist dieser Befund ohne größere Bedeutung.

Wichtig ist, daß alle Blutfarbstoffderivate, die eisenfrei sind, katalatisch und peroxydatisch unwirksam sind. Das gilt sowohl für das Mangan-meso-hämin, das man nach J. Zaleski[246]) durch Einführung von Mangan in Meso-porphyrin erhält und das also dem Meso-hämin völlig entspricht, nur daß an Stelle der > FeCl-Gruppe die > MnCl-Gruppe getreten ist, als auch für Meso-porphyrin und Hämatoporphyrin, die alle weder den Hydroperoxydzerfall, noch die Jodwasserstoffoxydation durch Hydroperoxyd beschleunigen. Auch wenn man zu den Porphyrinen Eisen in Form von Ferro-Ionen hinzu gibt, so erhält man dadurch keine peroxydatische oder katalatische Reaktionsbeschleuniger. Es besitzen also die Blutfarbstoffderivate nicht weil sie eisenhaltig sind, sondern weil in ihnen das Eisen in einer ganz besonderen Bindungsweise vorliegt, katalytische Eigenschaften. Aber nicht bei allen Blutfarbstoffderivaten sind die für eine katalytische Wirksamkeit notwendigen Bedingungen erfüllt (ich erinnere z. B. an das „Perhydrohämin"); außerdem gibt es manche Stoffe der Blutfarbstoff-Chemie (z. B. HbO_2), denen nur peroxydatische Eigenschaften zukommen, und das Maß der Wirksamkeit ist bei allen Blutfarbstoffderivaten nicht etwa dem Eisengehalt proportional, sondern abhänig von der speziellen Konstitution des betreffenden Blutfarbstoffderivates. Wie aber schon früher in dem Vergleich von Hämin, Dihydro-hämin und Meso-hämin gezeigt, kann unter gewissen Bedingungen ein Katalysator dem andern überlegen sein, während unter anderen Bedingungen der unter den ersten Bedingungen schwächer wirkende Katalysator dann der wirksamere ist.

[244]) dargestellt nach W. Küster, H. **109**, 122 (1920).
[245]) Siehe S. 55.
[246]) H. **43**, 11 (1904/05).

Ich habe vorhin gesagt, daß die Porphyrine auch nach Zusatz von Eisen in Form von Ferro-ionen nicht katalatisch oder peroxydatisch wirksam sind. Dies mag verwunderlich erscheinen, denn die peroxydatischen und katalatischen Fähigkeiten des Ferro-eisens sind ja sehr lange, zum Teil schon durch die Versuche Schönbeins[247]) bekannt. Es ist aber zu bedenken, daß die von mir bei den Blutfarbstoffderivaten angewandten Katalysator-konzentrationen sehr klein sind ($2{,}3 \cdot 10^{-5}$ Mol im Liter), und daß nur ein sehr wirksamer Katalysator bei so geringer Konzentration noch merklich die Reaktionsgeschwindigkeit erhöht. Die katalatische Wirkung von einer entsprechenden Menge Ferro-eisen konnte ich bei bei meinen Versuchsbedingungen überhaupt nicht nachweisen und aus einer Arbeit von St. Bertalan[248]), der bei seinen Versuchen eine hundertfach größere Eisenmenge angewandt hat, geht auch hervor, daß nach Umrechnung auf meine Versuchsbedingungen dem Ferro-ion nur eine drei- bis viertausendfach geringere katalatische Wirksamkeit zukommt, als dem Hämin (bezogen auf gleichen Eisengehalt), was verständlich macht, daß die katalatische Wirksamkeit von $2{,}3 \cdot 10^{-5}$ Mol Ferro-ionen sich der direkten Beobachtung entzieht. Dieser große Unterschied in der katalatischen Wirksamkeit von Hämin und Ferro-eisen verringert sich übrigens mit steigender Temperatur, da die katalatische Wirksamkeit des Ferro-ions bei 10° Temperaturerhöhung auf das 3,3fache ansteigt, während Hämin einen äußerst kleinen Temperaturkoeffizienten der Katalasewirkung hat (ca. 5% Wirksamkeitszunahme für 10° Temperaturerhöhung).

Die peroxydatischen Wirkungen von Ferro-ionen bei pH 5,72 gibt Figur 21 wieder. Die als Ferro-sulfat angewandte Eisenmenge war 11,7 fach so groß, wie die in 3 mg Hämin enthaltene. Die eingetragenen Werte bedeuten, wie bei den Kurven üblich, die Differenz im Thiosulfatverbrauch gegenüber dem Leerversuch. Während im Häminversuch die Differenz zwischen Haupt- und Leerversuch ständig größer wird, wächst in dem Versuch mit Ferro-eisen die Differenz zwischen Haupt- und Leerversuch nicht über den schon nach 2 Minuten erreichten Wert. Die Wirkung des Ferro-ions beschränkt sich also auf den allerersten Zeitintervall; es erweckt den Anschein, als ob es sich in diesem Fall nicht

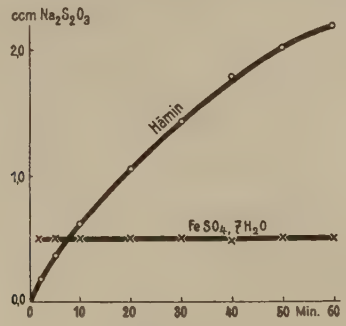
Siehe Tab. 40

---

[247]) C. F. Schönbein, Zeitschr. Biol. **1**, 273 (1865).

[248]) Ph. Ch. **95**, 328 (1920). Wahrscheinlich sind Eisen-(II)ionen neben Hydroperoxyd nur kurze Zeit beständig. Vgl. wegen der verschiedenen Ansichten hierüber J. Brode, Ph. Ch. **37**, 257 (1901) und W. Manchot, B. **34**, 2479 (1901) und vor allem die Erfahrungen von H. Wieland und Mitarbeiter (Vortrag in der Münchner Chem. Ges., 2. 6. 27). In bezug auf die katalatischen Eigenschaften sind aber, wie Bertalan gezeigt hat, Ferro- und Ferri-eisen gleichwertig.

um eine Katalyse, sondern um eine induzierte Reaktion handelt. Die quantitative Auswertung der Versuche lehrt auch, daß die Menge des im Versuch unter Zusatz von Ferro-eisen mehr in Freiheit gesetzten Jods gerade 1 Atom Jod pro Atom Eisen ist (genau 96% dieser Menge). Die plausibelste theoretische Deutung hierfür ist die Annahme eines



Figur 21.
Hämin und Ferro-sulfat als Peroxydasen.

intermediären Auftretens eines Ferro-peroxyds, das unter Jodwasserstoffoxydation und Bildung von Ferri-eisen zerfällt, gemäß den Gleichungen:

$$2\,FeO + 2\,H_2O_2 = 2\,FeO_2 + 2\,H_2O$$

und

$$2\,FeO_2 + 2\,HJ = Fe_2O_3 + H_2O + J_2$$

[249])

Da Ferri-eisen nicht mehr zur Bildung eines Peroxyds befähigt ist, so kommt damit die Reaktion zum Stillstand. Es steht diese Beobachtung im Widerspruch mit den Angaben von J. Brode; nun hat aber Brode in schwefelsaurer Lösung, ich in mit Phosphaten gepufferten Lösungen gearbeitet; es ist möglich, daß der Widerspruch hierauf zurückzuführen ist. Für neutrale, nicht gepufferte Lösungen, bei denen die Wirkungen des Ferro-eisens, wie schon Schönbein[250]) angibt, besonders auffällig sind, hat schon W. Manchot[251]) nachgewiesen, daß es sich bei

[249]) Man kann natürlich auch die Gleichungen als Ionen-gleichungen schreiben; man müßte dann die Existenz eines Ions $[Fe\,(H_2O_2)]''$ oder eines Ions $(OFe)''$ annehmen.

[250]) C. F. Schönbein, Journ. f. prakt. Chemie **79**, 66 (1860).

[251]) W. Manchot u. O. Wilhelms, B. **34**, 2479 (1901).

der Wirkung von Ferro-ionen nicht um eine Katalyse, sondern um eine induzierte Reaktion handelt, nur liegen in diesem Fall die stöchiometrischen Verhältnisse so, daß W. Manchot die intermediäre Bildung eines Eisen-pentoxyds annehmen muß. H. Wieland hat in seinem schon mehrfach erwähnten Vortrag mitgeteilt, daß unter anderen Bedingungen ein Atom Eisen sogar eine sehr erhebliche Zahl Jod-atome in Freiheit setzen kann. Die Größe des sogenannten Oxydationsstoßes scheint also in sehr hohem Maße von den Versuchsbedingungen abhängig zu sein. Brodes[252]) Angabe, daß dem Ferro-ion in schwefelsaurer Lösung echte katalytische Fähigkeiten bei der Beschleunigung der Jodwasserstoff-oxydation durch Hydroperoxyd zukommt, scheint mir trotz seines großen Versuchsmaterials nicht völlig überzeugend; Brode hat nach dem Vorbild W. Ostwalds[253]) die Halbwertzeiten der Reaktion in Gegenwart und Abwesenheit von Katalysatoren miteinander verglichen. Diese sehr bequeme Methode kann, wenn eine induzierte Reaktion und eine Leerreaktion sich überlagern, leicht zu dem Fehlschluß führen, daß eine wirkliche Katalyse vorliegt, was in Brodes Fall noch dadurch begünstigt wird, daß er die erste Messung erst 10 Minuten nach dem Zusammengeben der Lösungen macht, zu einem Zeitpunkt, wo die induzierte Reaktion schon längst abgelaufen ist. Aus diesem Grunde lassen sich aus Brodes Messungen nicht leicht irgendwelche Schlußfolgerungen ziehen; immerhin ist es aber möglich, daß in schwefelsaurer Lösung das Ferro-ion neben der induzierten Reaktion eine, wenn auch nicht sehr erhebliche peroxydatische Katalyse bewirkt, die vielleicht so zu erklären wäre, daß in schwefelsaurer Lösung das Ferri-ion durch den Jodwasserstoff langsam wieder zur Ferrostufe reduziert wird und dann erneut zur Peroxydbildung befähigt ist. In phosphathaltigen Lösungen bewirkt aber das Ferro-ion bestimmt nur eine induzierte Reaktion und keine peroxydatische Katalyse.

Noch anders liegen die Verhältnisse bei den zahlreichen von mir untersuchten komplexen, synthetischen Eisenverbindungen. Keiner von ihnen kommt eine peroxydatische oder katalatische Wirksamkeit von ähnlicher Größenordnung, wie den Blutfarbstoffderivaten zu [254]). Anderer-

---

[252]) Ph. Ch. **37**, 257 (1901).

[253]) Ph. Ch. **2**, 134 (1888).

[254]) Die Behauptung, daß ihnen überhaupt keine katalytischen Wirksamkeiten zukämen, ist natürlich nicht zulässig; unter den von mir angewandten Bedingungen ist aber ihre katalytische Wirksamkeit mindestens zwanzigmal kleiner als die von Hämin (d. h. nicht größer als die analytischen Fehler), wahrscheinlich aber noch viel geringer. Diese Angaben beziehen sich alle auf die Beschleunigung des Hydroperoxydzerfalls und der Oxydation von HJ durch H_2O_2. Die Oxydationen organischer Amino- und Hydroxyl-Verbindungen durch

seits bewirken aber die synthetischen komplexen Eisenverbindungen bei der peroxydatischen Jodwasserstoffoxydation auch nicht eine, sich in ihren Auswirkungen auf den ersten Zeitintervall beschränkende induzierte Reaktion, wahrscheinlich, weil in ihnen das Eisen infolge koordinativer Absättigung nicht zur Bildung eines Peroxyds befähigt ist. Eine Verbindung, bei der man infolge der äußeren Ähnlichkeit mit dem Blutfarbstoff auch eine katalytische Wirksamkeit[255]) vermuten könnte, ist das Tri-$\alpha\alpha'$-dipyridyl-ferro-bromid von F. Blau[256]). Ich habe diese Verbindung in schönen roten Kristallen gemäß der Vorschrift von F. Blau durch Zusammengeben von Ferro-bromid und $\alpha\alpha'$-Dipyridyl erhalten; dieses gewann ich nach der Methode von H. Meyer und A. Hofmann-Meyer[257]) durch thermische Zersetzung von Pyridin an einem rotglühenden Platindraht. Vielleicht ist die Blausche Verbindung deswegen katalytisch völlig unwirksam, weil durch die Komplexbildung die Ferrostufe so stabilisiert ist, daß das Oxydationspotential des Hydroperoxyds nicht ausreicht zur intermediären Bildung der entsprechenden blauen Ferri-verbindung, die ja ein so hohes Oxydationspotential hat, daß sie Wasser unter Sauerstoffentwicklung zersetzt. Auch wenn man dem Reaktionsgemisch außer der Blauschen Verbindung Gelatine- oder Tanninlösung zusetzt, um eine kolloidhaltige Lösung zu erhalten, so erzielt man keine peroxydatische Wirksamkeit. Ebenfalls unter meinen Versuchsbedingungen katalytisch unwirksam ist das Ferro-penta-cyan-aquo-natrium von K. A. Hofmann[258]), das ich, wie dieser Autor, aus Nitro-prussid-natrium durch Reduktion mit Hydroxyl-amin dargestellt habe. Die Unwirksamkeit dieser Verbindung ist deswegen erstaunlich, weil O. Baudisch[259]) gerade bei dieser Verbindung die ausgesprochenen katalytischen Eigenschaften rühmt; allerdings hat O. Baudisch zur Prüfung dieser katalytischen Eigenschaften andere Reaktionen herangezogen als ich. Ebensowenig katalytisch wirksam wie das Ferro-penta-cyan-aquo-natrium ist das ihm nahestehende Nitro-prussid-natrium. Auch die interessanten, leuchtend blauen Komplexverbindungen des Eisens mit Violur-säure[260]) und Iso-

Hydroperoxyd wird durch fast alle Eisenverbindungen recht unspezifisch beschleunigt (siehe darüber später).

[255]) Wenn im folgenden von der katalytischen Unwirksamkeit die Rede ist, so ist immer auf peroxydatische und katalatische Wirksamkeit geprüft worden.

[256]) M. **10**, 379 (1890). und M. **19**, 650 (1898).

[257]) H. Meyer u. A. Hofmann-Meyer, Journ. f. prakt. Chemie (2), **102**, 287 (1921).

[258]) A. **312**, 1 (1900).

[259]) Naturwissenschaften **13**, 749 (1925).

[260]) A. v. Baeyer, A. **128**, 300 (1863). Siehe auch W. Küster, H. **155**, 177 (1926).

nitroso-dimedon[261]) sind katalytisch völlig unwirksam; ob sie die Jodwasserstoffoxydation durch Hydroperoxyd beschleunigen, ist schwer festzustellen, da ihre kräftige, blaue Eigenfarbe ein genaues Titrieren verhindert; trotzdem läßt sich aussagen, daß sie jedenfalls nur in sehr geringem Maße, wahrscheinlich aber gar nicht diese Reaktion beschleunigen. Das Ferrosalz des 1·8·Oxychinolins[262]), das ich auf seine katalatische Wirksamkeit in 75%igem Pyridin untersucht habe, ist deswegen interessant, weil bei ihm ähnlich wie beim Hämin wahrscheinlich zwischen dem Eisen und den den heterocyklischen Ringen angehörigen Stickstoffatomen Nebenvalenzbeziehungen bestehen, die Verbindung aber wohl nicht in dem Maße koordinativ gesättigt ist, wie die Blausche Verbindung, bei der das Eisen mit 6 Stickstoffatomen in Nebenvalenzbeziehungen steht; aber im Gegensatz zum Hämin, das in 75%igem Pyridin sehr stark katalatisch wirksam ist, ist das Ferro-salz des 1·8·Oxychinolins unter diesen Bedingungen katalatisch völlig unwirksam, trotzdem ich die fünffache Menge zum Versuch genommen hatte, wie in den Häminversuchen (berechnet auf gleichen Eisengehalt).

Alle diese synthetischen komplexen Eisenverbindungen habe ich deswegen in den Kreis meiner Betrachtungen gezogen, weil ich hoffte, daß wenigstens einige von ihnen katalytische Eigenschaften ähnlicher Größenordnung aufweisen, wie die Blutfarbstoffderivate, und daß bei ihnen die Beziehungen zwischen Konstitution und katalytischer Wirksamkeit leichter durchsichtig seien, als bei den kompliziert gebauten Blutfarbstoffderivaten; leider war aber unter den von mir herangezogenen Stoffen keiner von ähnlicher Wirksamkeit wie die Blutfarbstoffderivate. Die genaue Untersuchung der Abhängigkeit der katalytischen Wirksamkeit eines Katalysators von den Reaktionsbedingungen habe ich, wie ja früher schon ausführlich dargelegt, beim Hämin durchgeführt, trotzdem natürlich das Oxyhämoglobin, der genuine Blutfarbstoff, schon aus biologischen Gründen viel mehr zu einer ausführlichen Untersuchung gereizt hätte. Dem stand aber vor allem die große Empfindlichkeit des Oxyhämoglobins entgegen. Man kann Oxyhämoglobin nicht aufbewahren, ohne daß seine katalytische Wirksamkeit abnimmt; ganz besonders stark tritt das bei warmen Sommerwetter zutage, aber auch im Winter, und beim Aufbewahren unter Eiskühlung nimmt die peroxydatische Wirksamkeit einer Oxyhämoglobin-lösung schon in wenigen Tagen recht beträchtlich ab. Da aber auch, selbst wenn man

---

[261]) P. Haas, Soc. **91**, 1433 (1907). Siehe auch W. Küster, H. **155**, 177 (1926).

[262]) R. Berg, Journ. f. prakt. Chemie (2), **115**, 178 (1927).

immer das Blut derselben Tierart verwendet, recht große individuelle Unterschiede zwischen zwei verschiedenen Oxyhämoglobinen bestehen, so läßt sich ein Versuchsergebnis nur mit derselben HbO_2-lösung, mit der es gewonnen wurde, und möglichst am selben Tag exakt reproduzieren. Es scheinen also bei der Jodwasserstoffoxydation durch Hydroperoxyd individuelle Unterschiede zwischen verschiedenen Oxyhämoglobinen aus dem Blut derselben Tierart von größerer Bedeutung zu sein, als bei der Pyrogallol-oxydation, die R. Willstätter und A. Pollinger untersucht haben[263]). Das Oxyhämoglobin habe ich, ähnlich wie es A. Madinaveitia[264]) angibt, aus Pferdeblut, das ja ein besonders gut kristallisierendes HbO_2 liefert, dargestellt. Ich habe mit dieser Methode bessere Erfahrungen gemacht, als mit der von M. Heidelberger[265]) beschriebenen, und sie hat der von F. Haurowitz[266]) angegebenen gegenüber den Vorzug der leichteren und schnelleren Ausführbarkeit, wenn vielleicht auch die Haurowitzsche Methode noch schonender ist als die von R. Willstätter und A. Madinaveitia, die sich an eine ältere des Hüfnerschen Instituts[267]) anschließt. Nach viermaligem Waschen der Erythrozythen mit isotonischer Kochsalzlösung (0,9% NaCl) habe ich die Blutkörperchen durch Zusatz eines gleich großen Volumens 37° warmen Wassers zur Hämolyse gebracht; nach dem Abkühlen auf 0° wird eine kleine Menge Äther zugesetzt, am nächsten Tage wird die klare HbO_2-Lösung (sogenanntes lackfarbenes Blut) von den oben schwimmenden Stromatas getrennt. Der Äther wird durch einen hindurchgesaugten Luftstrom entfernt, und danach wird zu der Lösung unter starkem Abkühlen (— 10°) und äußerst kräftigem Rühren sehr langsam Alkohol aus dem Tropftrichter dazu gegeben, und dann läßt man das Oxyhämoglobin bei — 10° auskristallisieren, wobei die ganze Lösung sulzig wird. Nach eintägigem Stehen (keinesfalls wärmer als 0°) wird eiskalt von dem Kristallbrei abzentrifugiert (in die Metallbecher der Zentrifuge, in die die Glasbecher gesetzt wurden, wird Äther gegeben; durch die Verdunstung des Äthers wird das HbO_2 vor Erwärmung geschützt); die Kristalle werden einmal mit eiskaltem

---

[263]) Es ist hierzu zu bemerken, daß ein Vergleich verschiedener Oxyhämoglobine nur bei den Versuchen, bei denen erst nach Ablauf einer Stunde das ausgeschiedene Jod titriert wurde, vorliegt. Es ist sehr leicht möglich, daß in diesen Versuchen, bei denen die Jodschädigung sehr groß ist, die Unterschiede in der Wirksamkeit vor allem auf einer Verschiedenheit der Empfindlichkeit der Eiweißkomponente gegen die Jodschädigung zurückzuführen ist.

[264]) Promotionsarbeit Zürich 1912: Zur Kenntnis der Katalase, S. 20.

[265]) Journ. of. Biol. Chem. **53**, 34 (1922).

[266]) H. **136**, 147 (1924).

[267]) Siehe K. Bürger in „Handbuch der physiologischen Methodik" von Tigerstedt Bd. 2, 93.

Wasser auf der Zentrifuge gewaschen, danach in möglichst wenig Wasser von höchstens 40° gelöst und durch Abkühlen auf — 2° zum erneuten Kristallisieren gebracht. Das wiederholte Umstristallisieren ist sehr verlustreich, da HbO_2 sich desto schwerer löst, je reiner und elektrolytfreier es ist. Man kann das Umkristallisieren etwas weniger verlustreich gestalten, wenn man das Auflösen in 40° heißem Wasser im Vakuum vornimmt. Das infolge des Abdissoziierens des O_2 bei dem niedrigen Druck entstehende Hämoglobin ist beträchtlich leichter löslich als Oxyhämoglobin. Man tut aber auch dann noch gut daran, wenn man dem Auflösungsvorgang Zeit läßt und sparsam mit der Zugabe von Wasser ist. Am besten verzichtet man darauf, daß sich die letzten Anteile auch lösen, zentrifugiert die noch warme Lösung ab, und hat so bestimmt eine bei 40° gesättigte Lösung. Das Umkristallisieren muß solange wiederholt werden, bis eine Probe keine katalatischen Wirkungen mehr zeigt (dies ist nicht durch Augenschein, sondern durch eine quantitative Bestimmung festzustellen). Meistens wird das Oxyhämoglobin nach dreimaligem Umkristallisieren katalasefrei sein. Es werden dann in noch feuchtem Zustand die Kristalle der ersten katalasefreien HbO_2-Kristallisation aufgelöst; durch einen Vorversuch stellt man die ungefähre Wirksamkeit dieser Lösung fest und bringt sie dann evtl. durch Verdünnen auf ein zusagendes Maß. Der HbO_2-Gehalt der Lösung wurde durch Eisenbestimmung in einem aliquoten Anteil ermittelt. Die Eisenbestimmungen erfolgten kolorimetrisch, entweder nach der Rhodanidmethode von R. Willstätter[268]) oder mit Sulfosalicylsäure nach L. Lorber[269]).

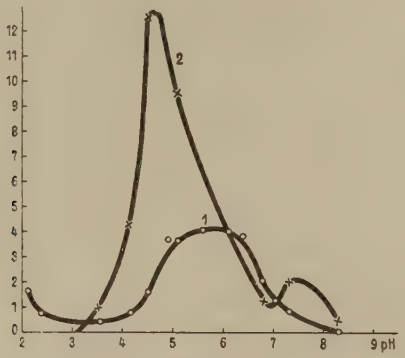
Figur 22 gibt die pH-Abhängigkeit der HbO_2-Peroxydasewirkung wieder (die eingesetzten Werte bedeuten wieder ccm $\frac{n}{10}$ Thiosulfat Mehrverbrauch des Hauptversuchs gegenüber dem Leerversuch). Die Werte der Kurve 1 wurden so gewonnen, daß unter den üblichen Bedingungen ein Peroxydaseversuch unter Verwendung von 10,4 mg HbO_2 als Katalysator angesetzt, aber erst nach einer Stunde titriert wurde. Auf diese Weise konnte eine größere Anzahl von Versuchen nebeneinander angesetzt, und so alle Punkte der pH-Kurve an einem Tage bestimmt werden. Der Nachteil bei dieser Methode ist, daß das freiwerdende Jod, da es ja nicht fortlaufend wegtitriert wird, das Oxyhämoglobin stark schädigt; nach Ablauf des Versuchs ist das gesamte Oxyhämoglobin in Form von braunen Flocken ausgefallen. Bei fortlaufender Titration ist bei derselben Katalysatormenge und Verwendung

Siehe Tab. 41

---

[268]) B. **53**, 1152 (1920).
[269]) Bio.Z. **181**, 393 (1927).

derselben Oxyhämoglobinlösung eine um mehr als 130% größere Wirksamkeit des HbO_2 zu beobachten.



Figur 22.
pH-Kurve der Peroxydasewirkung des HbO_2.

Aus diesem Grund habe ich eine zweite Versuchsreihe, die durch
Siehe Tab. 41a
Kurve 2 dargestellt wird, mit einer neuen Oxyhämoglobinlösung so angestellt, daß ich die Versuche nur 10 Min. gehen ließ, während dieser Zeit aber fortlaufend das ausgeschiedene Jod titriert habe. Um in dieser kurzen Reaktionsdauer eine nicht zu kleine HbO_2-Wirkung zu bekommen, verwandte ich eine wesentlich größere Katalysatormenge als in der ersten Versuchsreihe, nämlich 235 mg HbO_2 (es ist zu bedenken, daß das HbO_2 nur 0,34% Eisen enthält, also 235 mg HbO_2 nur 0,8 mg Fe). Infolge der kurzen Reaktionsdauer dieser Versuche war es mir möglich, trotzdem gleichzeitig immer nur ein Versuch lief, sämtliche pH-Punkte in knapp 10 Stunden zu bestimmen; gegen Ende der 10 Stunden wurde ein am Anfang gemachter Versuch nochmals wiederholt; es wurde derselbe Wert erhalten — ein Zeichen, daß eine Korrektur infolge Alterung der HbO_2-Lösung nicht notwendig ist. Eine Abscheidung brauner Flocken, wie sie in den Versuchen ohne fortlaufende Titration beobachtet wurde, fand unter diesen Bedingungen nicht statt, so daß die Jodschädigung wohl zum größten Teil ausgeschaltet war. Die trotzdem beobachtete starke Abnahme der Reaktionsgeschwindigkeit mit der Zeit, derentwegen es nicht möglich ist, Geschwindigkeitskonstanten der Reaktion anzugeben, ist wohl auf die schädigende Wirkung des Hydroperoxyds zurückzuführen. Bemerkenswert ist, wie die

Verschiedenheit der Ausführung der beiden Versuchsreihen die Gestalt der pH-Kurve wesentlich beeinflußt. In dem Versuch ohne Ausschluß der Jodschädigung und mit längerer Versuchsdauer ist das pH-Optimum viel flacher und breiter als in den Versuchen, in denen durch fortlaufende Titration die Jodschädigung verhindert wird, und die Versuchsdauer nur 10 Min. beträgt. Bei Kurve 1 liegt das Optimum zwischen pH 5 und pH 6 mit einem schwach ausgeprägten Gipfel bei etwa pH 5,6; bei Kurve 2 liegt das ph-Optimum, das nur ein sehr viel schmaleres Gebiet umfaßt, bei einer zehnfach größeren Wasserstoffionen-konzentration, nämlich bei pH 4,6. In beiden Fällen besteht keine Beziehung zwischen dem isoelektrischen Punkt des HbO_2 und dem pH-Optimum seiner peroxydatischen Wirksamkeit; nach H. v. Euler[270]) soll bei der Sacharase iso-elektrischer Punkt und pH-Optimum zusammenfallen. Bei den Enzymen aber wissen wir ja nicht, inwieweit ihre physikalischen Eigenschaften durch zufällige Begleiter beeinflußt werden, da man ja selbst bei den besten Präparaten nicht angeben kann, wieviel Prozent „Enzym" das Präparat enthält. Als Beispiel für die Abhängigkeit des iso-elektrischen Punktes eines Enzyms von seinem Reinheitsgrad seien die Erfahrungen von R. Willstätter, J. Graser und R. Kuhn[271]) beim Invertin angeführt, die auf Grund von Kataphorese-versuchen angeben, daß der elektronegative Charakter des Invertins hauptsächlich durch Begleitstoffe bedingt sei. Das HbO_2 ist nun aber im Gegensatz zu den Enzymen ein chemisch wohldefinierter, rein darstellbarer, kristallisierter Körper; sein iso-elektrischer Punkt wird sowohl von L. Michaelis und Y. Airila[272]), als auch von R. M. Ferry[273]) zu 6,8 angegeben. Bei diesem pH-Punkt hat die Kurve 1 knapp die Hälfte ihres maximalen Wertes, die Kurve 2 sogar nur ein Zehntel ihrer maximalen Höhe. Die Kurve 2, der ich, da ja bei ihr die störenden Einflüsse weitgehender ausgeschaltet sind als bei Kurve 1, größere Bedeutung zumesse, zeigt sogar bei pH 6,8 ein schwach angedeutetes Wirksamkeitsminimum. Beim HbO_2 fallen also ganz bestimmt nicht peroxydatisches Wirksamkeitsmaximum und iso-elektrischer Punkt zusammen.

Zur weiteren Stützung dieses Ergebnisses habe ich auch die pH-Abhängigkeit der Beschleunigung der Pyrogallol-oxydation mit Hydroperoxyd durch HbO_2 untersucht. Es ist in diesem Fall die von R. Will-

---

[270]) H. v. Euler u. H. Josephson, H. **133**, 279 (1924), und zwar S. 289 ff.
[271]) H. **123**, 1 (1922), und zwar S. 73.
[272]) Bio.Z. **118**, 144 (1921).
[273]) Journ. biol. chem. **57**, 819 (1923).

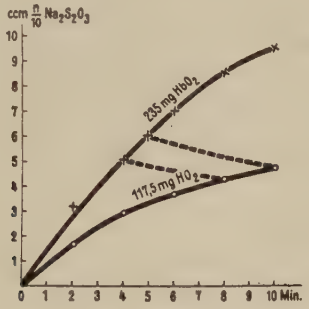
stätter[274]) angewandte kolorimetrische Bestimmung des gebildeten Purpurogallins schwierig, da der Farbton der Oxydationsprodukte mit der Änderung des pH ebenfalls eine Änderung erleidet, und beim Vergleich zweier Versuche das Ergebnis von der absoluten Schichthöhe im Koloriometer abhängig ist, da das Beersche Gesetz nicht streng erfüllt ist. Die Versuchsansätze, die in den meisten Punkten mit denen von R. Willstätter und A. Pollinger übereinstimmen, waren folgende: Das Reaktionsvolumen von 200 ccm enthielt reinstes 5 g Pyrogallol (Merck), 20 ccm $\frac{m}{5}$ Phosphatpuffer, 20 ccm 0,17n H_2O_2 und 52 mg HbO_2 (3 ccm Katalysatorlösung), die in der hier angeführten Reihenfolge zugegeben wurden (H_2O_2 und HbO_2 kurz hintereinander, das letzte im Moment der Zeitstoppung); Reaktionstemperatur 0°, Reaktionsdauer 60 Min. Die Stoppung erfolgt durch verdünnte Schwefelsäure; da diese Stoppung aber unvollkommen ist, muß die Ausätherung des Purpurogallins gleich anschließend erfolgen; die ätherische Purpurogallinlösung wird mit entwässertem Natriumsulfat getrocknet und nach dem Abfiltrieren auf ein bestimmtes Volumen aufgefüllt und kolorimetriert. In besonderen Versuchen habe ich unter gleichen Versuchsbedingungen die Purpurogallin-bildung ohne Katalysator bei wechselndem pH untersucht; die im Leerversuch gebildeten Purpurogallinmengen waren aber so klein, daß sie bei der sehr beträchtlichen Ungenauigkeit der kolorimetrischen Bestimmung ruhig unberücksichtigt bleiben konnten. Als Standard, mit dem die Purpurogallin-mengen aller anderen Versuche verglichen wurden, diente der Versuch bei pH 6,8 (auf diese Weise sind die erhaltenen Werte nur Relativwerte). Die Tabelle ergibt sich aus einer Umrechnung, bei der dem Versuch mit der größten Purpurogallin-menge (pH 5,2) die Relativzahl 100 gegeben worden ist. Die wenigen Versuche mit der Purpurogallin-methode zeigen, daß auch bei diesem Akzeptor das peroxydatische Wirkungsmaximum des HbO_2 nicht mit dem iso-elektrischen Punkt zusammenfällt, sondern zwischen pH 5 und pH 6 liegt; die pH-Kurve, von deren graphischen Wiedergabe ich aber infolge der ungenauen Bestimmungsmethode und der geringen Zahl untersuchter pH-Punkte abgesehen habe, scheint in diesem Fall sehr flach zu verlaufen.

Siehe Tab. 41b

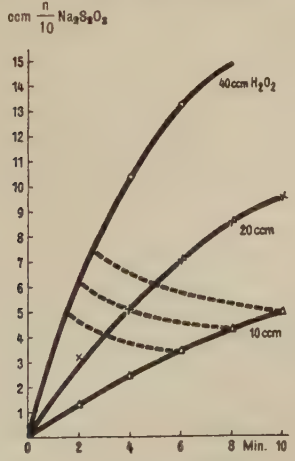
Außer der pH-Abhängigkeit der peroxydatischen HbO_2-Wirkung habe ich auch den Einfluß der HbO_2-Konzentration, der H_2O_2-Konzentration und der KJ-Konzentration auf das Ausmaß der Beschleunigung der HJ-Oxydation mit H_2O_2 durch HbO_2 untersucht. Alle diese Versuche sind nach der zu zweit angeführten Methode ausgeführt worden

[274]) H. **130**, 280 (1923).

(235 mg HbO_2, fortlaufende Titration, 10 Min. Reaktionsdauer); das pH dieser Versuchsansätze war stets 5,10. Zwischen Katalysatormenge und Jodausscheidung besteht fast ganz genaue Proportionalität, wie aus Figur 23 zu ersehen ist. Siehe Tab. 42



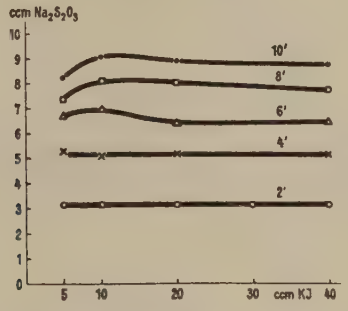
Figur 23.
Die Peroxydasewirkung des Oxyhämoglobins in Abhängigkeit von der angewandten HbO_2-Menge.



Figur 24.
Die Peroxydasewirkung des Oxyhämoglobins in Abhängigkeit von der angewandten H_2O_2-Menge.

Die allmähliche Schädigung des Katalysators wird durch die abwärts zeigenden Gabeln verdeutlicht; von zwei Versuchen, bei denen

das Produkt Zeit × Katalysatormenge konstant ist, wird die größere Jodmenge stets im Versuch mit kürzerer Reaktionsdauer in Freiheit gesetzt. Auch zwischen der H_2O_2-Menge und der Differenz der Jodausscheidung in Haupt- und Leerversuch besteht weitgehende Pro-
Siehe Tab. 43 proportionalität, wie aus Figur 24 zu ersehen ist. Es weisen die Gabeln auch in diesem Fall nach abwärts; es ist also im Gegensatz zu den ent-
Siehe Tab. 44 sprechenden Hämin-peroxydase-versuchen die HbO_2-Schädigung durch H_2O_2 in geringerem Maße von der H_2O_2-Konzentration, als von der Einwirkungsdauer des Hydroperoxyds abhängig[274a]). Interessant ist, wie Figur 25 zeigt, daß die KJ-Konzentration nur von sehr kleinem Einfluß auf die peroxydatische Wirksamkeit des Hämins ist; bei



Figur 25.
Die Peroxydasewirkung des Oxyhämoglobins in Abhängigkeit von der angewandten Kalium-jodid-Menge.

einer Verachtfachung der KJ-Konzentration steigt die Differenz zwischen Haupt- und Leerversuch um weniger als 10%; wenn man die Werte für die längere Zeitdauer bei der kleinsten KJ-Konzentration wegläßt (und das ist aus reaktions-kinetischen Gründen berechtigt), so ist innerhalb der analytischen Fehlergrenzen die peroxydatische Wirksamkeit des HbO_2 unabhängig von der KJ-Konzentration. Die Geschwindigkeit der Leerreaktion ist, wie früher erwähnt, direkt proportional der KJ-Konzentration. Ich bin der Ansicht, daß die Unabhängigkeit der katalysierten Reaktion von der KJ-Konzentration darauf beruht, daß das HbO_2, das zwar im Gegensatz zum Hämin keinerlei katalatische Wirksamkeit hat, doch ebenso wie das Hämin mit dem Hydroperoxyd in Wechselwirkung tritt. Es ist also das Hydro-

[274a]) Ebenso wie bei der Häminkatalasewirkung.

peroxyd, das am Katalysator aktiviert wird, nicht der Jodwasserstoff.

Kurz erwähnt werden soll an dieser Stelle, daß das Kohlenoxyd-hämoglobin ungefähr die gleiche peroxydatische Wirksamkeit hat wie das HbO_2. Die Versuche mit dem Kohlenoxyd-hämoglobin wurden genau so, wie die zuletzt beschriebenen ausgeführt. Zur Darstellung des Kohlenoxyd-hämoglobins wurde in eine HbO_2-Lösung eine halbe Stunde lang ein lebhafter CO-Strom eingeleitet, danach zur Vertreibung des überschüssigen CO 10 Minuten lang ein Stickstoffstrom; von dieser Lösung wurde eine Menge verwandt, die 235 mg HbO_2 entsprach. Sowohl bei pH 5,10, als auch bei pH 6,88 war das CO-Hämoglobin um ein geringes wirksamer als das Oxy-hämoglobin, doch war der Unterschied kaum größer als die möglichen analytischen Fehler. Es beweist dieser Versuch, daß das Kohlenoxyd nicht die Stelle des Hämoglobinmoleküls beschlagnahmt, an der das Hydroperoxyd aktiviert wird, es sei denn, daß das H_2O_2 in der Lage ist, das CO zu verdrängen. Interessant ist, daß das HbO_2 und die ihm nahestehenden Verbindungen: Kohlenoxyd-hämoglobin, Methämoglobin usw. mit dem Hämin die peroxydatischen Fähigkeiten gemein haben, während sich nach W. Lipschitz[275]) das HbO_2 dem Hämin gegenüber durch die Fähigkeit, Hydroxylamin katalytisch zu zersetzen, auszeichnet, umgekehrt hat nur das Hämin, nicht aber das HbO_2 katalatische Eigenschaften. Siehe Tab. 45

An der pH-Abhängigkeit der Wirksamkeit pflanzlicher Peroxydase auf die Jodwasserstoffoxydation[276]) ist der ungemein große Einfluß, den die Art der verwandten Pufferlösungen haben, interessant. Siehe Tab. 46

Figur 26 zeigt den ganz und gar verschiedenen Verlauf der pH-Kurve der Werte, die mit Phosphat- oder Acetatpuffer gemacht worden sind. Die Versuchsbedingungen waren die üblichen; die Thiosulfattitration erfolgte fortlaufend; die Kurven geben die 15 Minuten-Werte wieder. Das Peroxydasepräparat verdanke ich der Freundlichkeit von Herrn Geheimrat Professor Dr. Richard Willstätter, dem ich auch an dieser Stelle meinen ergebenen Dank auszusprechen mir erlaube. Das Präparat hatte, als es dargestellt wurde, die Purpurogallinzahl 540; für jeden Versuch verwandte ich 0,9 mg. Man sieht, daß unter meinen Bedingungen diesem nicht sehr hochwertigen Peroxydasepräparat[277]),

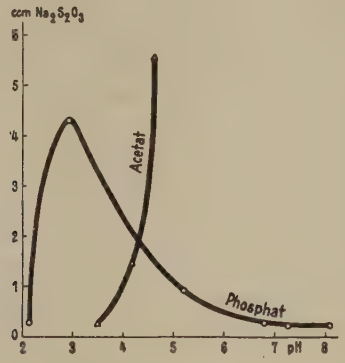
---

[275]) H. **146**, 1 (1925).

[276]) E. Abel, Zeitschr. f. Elektr. Chem. **28**, 489 (1922).

[277]) Es sind von R. Willstätter Peroxydasenpräparate von einer Purpurogallinzahl 3000 bis 4000 dargestellt worden. Die große Wirksamkeit dieser nur noch einen sehr geringen Eisengehalt aufweisenden Peroxydasepräparate veranlaßt R. Willstätter mit Recht anzunehmen, daß die Peroxydasen ihre katalytischen Eigenschaften nicht ihrem Eisengehalt verdanken.

das überdies noch einige Jahre alt war, eine mehr als 75fach größere peroxydatische Wirksamkeit zukommt, als dem HbO_2. Die pflanzliche Peroxydase hat für die Jodwasserstoffoxydation bei Verwendung von Phosphatpuffern ihr Wirksamkeitsmaximum bei ca. pH 3, in welchem



Figur 26.
pH-Kurve der pflanzlichen Peroxydase unter Verwendung von Phosphat und Acetatpuffern.

Aciditätsgebiet HbO_2 schon fast nicht mehr wirksam ist. Das dürfte die Erklärung für E. v. Czyhlarz und O. v. Fürths[278]) nur bedingt gültige Angabe sein, daß HbO_2 im Gegensatz zur pflanzlichen Peroxydase die Jodwasserstoffoxydation mit H_2O_2 nicht beschleunige, da diese Autoren stets Lösungen beträchtlicher Acidität verwandt haben.

Immerhin ist zu bedenken, daß nach meinen Befunden das „Pyridin"-hämin ca. 10000 mal katalatisch wirksamer ist als eine äquivalente Menge Eisen in Form von Ferro-ionen. Die Wirksamkeit des Eisens ist also in sehr hohem Maße eine Funktion seiner Bindungsweise; es wäre denkbar, daß es in der Peroxydase in einer Bindungsweise vorliege, in der es eine noch viel größere Wirksamkeit aufweist. Der größere Gehalt an Eisen unreinerer Peroxydasepräparate, von R. Willstätter bei der Reinigung entfernt, wäre dann gewissermaßen als Schlacke anzusehen, während nur ein geringer Teil des Eisens in der notwendigen, es so sehr stark aktivierenden Bindungsweise vorläge. Doch soll hiermit nicht etwa behauptet werden, daß die Peroxydasen infolge ihres Eisengehaltes wirksam sind, sondern nur rein theoretisch sollte die Möglichkeit diskutiert werden.

[278]) Hofmeisters Beiträge **10**, 358 (1907).

8. Einige Versuche über die Beschleunigung anderer peroxydatischer Reaktionen.

Einige mehr qualitative Ergebnisse, die ich bei der Variation einer der beiden Reaktionsteilnehmer der peroxydatischen Reaktion erhielt, will ich noch kurz erwähnen. Weder Kalium-chlorat noch Kalium-bromat bewirken unter ähnlichen Reaktionsbedingungen, wie den von mir bei Verwendung von H_2O_2 angewandten, eine genügend schnelle Oxydation des Jodwasserstoffs, um in relativ kurzen Versuchszeiten eine exakte Messung zu gewährleisten; der ungemein langsame Verlauf der Leerreaktion wäre ja nur angenehm, wenn die katalysierte Reaktion einigermaßen rasch verliefe; dies ist aber bei Verwendung von Hämin als Katalysator nicht der Fall. R. L. Mayer[279]) mußte, um die Beschleunigung der Jodwasserstoffoxydation mit Chlorat durch Oxyhämoglobin untersuchen zu können, mit $\frac{n}{1000}$ $Na_2S_2O_3$ titrieren und außerdem noch die Reaktionszeiten ziemlich lang wählen. Biologisch ist diese Reaktion deswegen interessant, weil das Freiwerden des Jods mit der Methämoglobin-bildung Hand in Hand geht. Im Gegensatz zum Chlorat und Bromat bewirkt das Jodat eine sehr rasche Oxydation des Jodwasserstoffs; vor allem ist diese Reaktion ja ungemein abhängig von der Wasserstoff-ionen-konzentration; vielleicht würde sie sich aber in der Nähe des Neutralpunktes und bei genügend kleiner Konzentration der Reaktionsteilnehmer zur quantitativen Bestimmung der peroxydatischen Wirksamkeit eines Katalysators verwenden lassen, wenn auch die Anwendbarkeit dieser Reaktion wegen ihrer ungemein großen pH-Abhängigkeit sicherlich eine viel geringere wäre, als die der Jodwasserstoff-oxydation durch Hydroperoxyd. Der Ersatz des Hydroperoxyds durch Tri-methyl-amin-oxyd, von dem D. Ackermann[280]) in neuester Zeit hervorgehoben hat, daß es bei Dehydrierungs-reaktionen als Wasserstoffakzeptor fungieren kann, war deshalb wichtig, weil das Tri-methyl-amin-oxyd in manchen Organismen angetroffen wird. Die Abspaltung molekularen Sauerstoffs aus dem Tri-methyl-amin-oxyd wird durch Hämin nicht bewirkt; es wäre dies die der Katalasewirkung des Hämins entsprechende Reaktion. Die Jodwasserstoff-oxydation durch Tri-methyl-amin-oxyd erfolgt äußerst langsam, sowohl in Abwesenheit als auch in Anwesenheit von Hämin; ich konnte nicht entscheiden, ob diese langsame Oxydation durch das Tri-methyl-amin-oxyd selbst oder

---

[279]) Arch. für exper. Pathol. **95**, 351 (1922).

[280]) D. Ackermann, K. Poller u. W. Linneweh, H. **59**, 2750 (1926).

durch in geringer Menge allmählich entstehendes Hydroperoxyd (aus dem Amin-oxyd durch Hydrolyse) bewirkt wird. Wenn man dagegen Benzidin in essigsaurer Lösung mit Tri-methyl-amin-oxyd zusammenbringt, so wird die zuerst farblos bleibende Lösung beim Zusatz eines Tropfens sehr verdünnter Häminlösung sofort schön blau; der Farbton ist weniger tief wie bei Verwendung von Hydroperoxyd. Irgendwelche Schlüsse aus dieser Erscheinung ziehen zu wollen, halte ich für unangebracht, weil die Benzidinreaktion einerseits ungemein empfindlich, andererseits ganz unspezifisch ist. Die folgende Tabelle ist eine Zusammenstellung meiner Beobachtungen über die Farbtöne, die man erhält, wenn man zu einer kalt gesättigten Benzidinlösung, die mit dem gleichen Volumen 0,17n Hydroperoxyd gemischt und mit Essigsäure angesäuert ist, verschiedene Katalysatoren in kleiner Konzentration hinzufügt.

Angewandter Katalysator:	Farbenfolge:
Blutkörperchenlösung	blau-grün-rotbraun
Hämin	tief blau — nachher rotbraun
Mesohämin	tief blau — nachher rotbraun
Dihydrohämin	grünstichiges blau
„Perhydrohämin“	blau
Manganmesohämin	—
Kupfersalz des Mesoporphyrins	sehr langsam sich bläuend
Tri-$\alpha\alpha'$-dipyridyl-ferro-bromid	—
Ferro-penta-cyan-aquo-natrium	blau
$Fe^{\cdot\cdot}$	über blau schnell rotbraun
$Fe^{\cdot\cdot\cdot}$	—
$Mn^{\cdot\cdot}$	—
$Ni^{\cdot\cdot}$	—
$Cu^{\cdot\cdot}$	—
VO_2'	über grün in blau (auch ohne H_2O_2! Oxydasewirkung des VO'_3!)
$Ce^{\cdot\cdot}$	—
$Ce^{\cdot\cdot\cdot\cdot}$	gelb (Cer-peroxydbildung!)
TiO_2	rotgelb (Pertitansäure-bildung)
$Cr^{\cdot\cdot\cdot}$	—

Die angesäuerte und mit H_2O_2 zersetzte Benzidinlösung war selbst nach 48 Stunden nur ganz schwach gelb gefärbt.

Macht man dieselben Versuche in nicht angesäuerter Lösung, so erhält man ähnliche, aber schmutzigere Farbtöne; bemerkenswert ist nur, daß in neutraler Lösung auch Ferri-ionen die Farbstoffbildung hervorrufen, während sie in saurer Lösung unwirksam ist. Verwendet man anstatt Benzidin Para-phenylen-diamin als dehydrierbare Substanz, so sind die erzielten Ergebnisse noch weniger spezifisch, vor allem,

weil Hydroperoxyd auch ohne Katalysator allmählich Para-phenylendiamin oxydiert. Es scheint dieser Vorgang durch kleine Mengen Eisen, die im Para-phenylen-diamin enthalten sind, bewirkt zu werden, denn er wird durch Blausäurezusatz gehemmt.

C. Übersicht über die Leistungsfähigkeit verschiedener Katalysatoren.

Zum Schluß seien noch einige Zahlen über die katalatischen und peroxydatischen Leistungen verschiedener Katalysatoren zusammengestellt. Die Blutfarbstoffderivate nehmen in bezug auf ihre katalytischen Leistungsfähigkeiten eine Mittelstellung ein zwischen dem katalatisch nur sehr langsam wirkenden Ferro-eisen und den so ungemein wirksamen, uns in ihrer chemischen Konstitution unbekannten Enzymen. Um die Größenordnung zu charakterisieren — und mehr ist nicht möglich, da die Umrechnung auf andere Reaktionsbedingungen immer ein gewisses Moment der Unsicherheit in die Zahlenangaben hineinbringt — sei angeführt, daß Hämin 3000 bis 4000 mal stärker als Katalase wirkt als Ferro- bzw. Ferri-ion (berechnet auf gleichem Eisengehalt und unter Zugrundelegung der Zahlen von St. Bertalan[281])). Zieht man zu diesem Vergleich „Pyridin-hämin" heran, so ergibt sich sogar das Verhältnis 10000:1 zwischen „Pyridin-hämin" und Ferro-ion. Andererseits sind, berechnet nach den Angaben von S. Hennichs[282]) und H. v. Euler[283]) die besten Leberkatalasepräparate ihrerseits wieder etwa 10000 mal katalatisch wirksamer als Hämin (berechnet auf gleiche Einwage), während kolloidales Platin nach G. Bredig[284]) nur von etwa 1,5fach größerer katalatischer Wirksamkeit ist, als „Pyridin-hämin".

Zur Charakterisierung der peroxydatischen Leistungsfähigkeit des Hämins sei angeführt, daß das „Pyridin-hämin" etwa 100000 mal wirksamer ist, (berechnet aus der Dehydrierungsleistung eines Moleküls) als das neuerdings von W. Langenbeck[285]) als Modell dehydrierender Enzyme untersuchte Isatin, während wiederum die besten Peroxydasepräparate R. Willstätters[286]) etwa 10000 mal wirksamer sind, als das „Pyridin-hämin" (berechnet auf gleicher Einwage), was deswegen besonders bemerkenswert, weil der Eisengehalt dieser besten

---

[281]) Ph. Ch. **95**, 328 (1920).
[282]) Bio.Z. **171**, 314 (1926).
[283]) A. **452**, 158 (1927).
[284]) Nach S. Hennichs, Bio.Z. **145**, 286 (1924).
[285]) B. **60**, 931 (1927).
[286]) R. Willstätter u. A. Pollinger, A. **430**, 269 (1922/23).

Peroxydasepräparate nur noch sehr gering ist (0,06% und noch geringer).

Weit genauere Angaben als die vorhergehenden, nur die Größenordnung charakterisierenden, kann ich über die relative Wirksamkeit der von mir untersuchten Katalysatoren machen, da ja eine besondere Umrechnung, weil ich immer dieselben Reaktionsbedingungen angewandt habe, nicht nötig ist.

Es werden durch ein Mol Hämin katalatisch zersetzt bei

Verwendung von:	„Na_2HPO_4-hämin“	„Pyridin-hämin“
in 10 Minuten	36 Mol H_2O_2	120 Mol H_2O_2
in 60 Minuten	110 Mol H_2O_2	250 Mol H_2O_2

Es werden durch ein Mol Hämin bei der H_2O_2-HJ-Reaktion peroxydatisch aktiviert:

bei Verwendung von:	„Na_2HPO_4-hämin“	„Pyridin-hämin“
in 10 Minuten	7 Mol H_2O_2	35 Mol H_2O_2
in 60 Minuten	25 Mol H_2O_2	88 Mol H_2O_2

Ein Mol HbO_2 aktiviert bei der H_2O_2-HJ-Reaktion (unter Ausschluß der Jodschädigung)

in 2 Minuten	26 Mol H_2O_2	[9 Mol H_2O_2	„Pyridinhämin“]
in 10 Minuten	45 Mol H_2O_2	[35 Mol H_2O_2	als Vergleich.]

Bei der Pyrogallol-oxydation aktiviert nach R. Willstätter[287]) ein Molekül HbO_2, auf meine Reaktionsbedingungen umgerechnet, in 5 Minuten 55 Mol H_2O_2. Die peroxydatische Wirksamkeit des HbO_2 ist also bei der HJ-Oxydation und der Pyrogallol-oxydation von derselben Größenordnung, während R. Willstätter und H. Weber[288]) gefunden haben, daß die pflanzliche Peroxydase bei der Leuko-malachitgrün-oxydation etwa 40fach wirksamer ist, als bei der Pyrogallol-oxydation.

Um das Verhältnis der peroxydatischen Leistungsfähigkeit des Hämins und des Oxyhämoglobins bei der HJ-Oxydation anschaulicher zu machen, habe ich die obigen Zahlen noch so umgerechnet, daß ich der Wirksamkeit des „Na_2HPO_4-hämins“ den Wert 1 gegeben habe. Es ergibt sich dann für die peroxydatischen Wirksamkeiten folgende Tabelle:

	„Na_2HPO_4-hämin“	„Pyridin-hämin“	Oxyhämoglobin
2 Min.-Werte	1	5,8	14,2
10 Min.-Werte	1	5,1	6,5

[287]) R. Willstätter u. A. Pollinger, H. **130**, 280 (1923).
[288]) A. **449**, 156 (1926).

Es ist also für kurze Reaktionsdauer das HbO_2 mehr als doppelt so stark peroxydatisch wirksam, als selbst das „Pyridin-hämin". Da aber das HbO_2 auch am empfindlichsten gegen die Schädigung durch das Hydroperoxyd ist, so bewirkt bei längerer Reaktionsdauer das „Pyridin-hämin" eine fast eben so große Beschleunigung der Jodwasserstoffoxydation, wie das Oxyhämoglobin.

IX. Kapitel.

Experimentelle Daten.

A. Tabellarische Zusammenstellung der dem Kapitel VIII zugrunde liegenden Messungen.

In nachfolgendem sind die Meßresultate, die den vorhergehenden Ausführungen zugrunde liegen, zusammengestellt. Ganz kurz sind noch jeweils die im Textteil ausführlich besprochenen Versuchsbedingungen skizziert. Wenn dieselben Versuchsbedingungen wie bei einer vorhergehenden Tabelle vorliegen, wird auf diese verwiesen. Am Seitenrand steht immer die Textseite zu der die Tabelle gehört. Die Tabellen 1—19 beziehen sich auf Katalasewirkungen, Tabellen 20—31 auf Peroxydasewirkungen, was nicht jeweils besonders vermerkt wird, während bei den dann folgenden Tabellen immer hinzugefügt ist, worauf sie sich beziehen.

Tabelle 1. Siehe S. 69

Kinetik der Häminkatalasewirkung.

Versuchsbedingungen: 100 ccm 0,170n H_2O_2 + 100 ccm $\frac{m}{5}$ Phosphat + 15 mg Hämin zu 1000 ccm; pH 7,93; 0°. Zur Titration je 50 ccm entnommen.

Zeit (Min.)	ccm $\frac{n}{10}$-$KMnO_4$ Verbrauch (x)	Abnahme	Umsatz (%)	$k = \frac{10^4}{t-10} \log_{10} \frac{7,98}{x}$
0	8,90	—	—	—
10	7,98	0,92	10,3	(47,4)
20	7,60	1,30	14,6	21,2
30	7,20	1.70	19,1	22,3
40	6,88	2,02	22,7	21,5
50	6,58	2,32	26,1	20,9
60	6,38	2,52	28,3	19,5
90	5,72	3,18	35,8	18,1
120	5,01	3,89	43,7	18,4
180	4,28	4,62	51,9	15,9
300	2,70	6,20	69,6	16,2
420	2,06	6,84	76,8	16,8

Die Reaktionskonstanten sind mit Rücksicht auf die abnorm hohe Anfangsgeschwindigkeit, die ich wiederholt bestätigt fand, unter Vernachlässigung des ersten Reaktionsintervalls berechnet.

Siehe S. 69

Tabelle 2.

pH-Kurve (gealterte Häminlösung).

Versuchsbedingungen: 20 ccm 0,17n H_2O_2 + 20 ccm $\frac{n}{5}$ Phosphat-Puffer + 3 mg Hämin = 0,264 mg Fe: 200 ccm; Reaktionsdauer 60 Min.; 0°). Die Maßzahlen sind ccm $\frac{n}{10}$ $KMnO_4$ Minderverbrauch.

ph	2,12	5,72	6,88	7,93
Versuchsreihe I	5,22	8,55	9,09	9,27
Versuchsreihe II	—	8,80	9,25	9,42

Die Versuchsbedingungen der Tabelle 2 sind die Normalkatalaseversuchsbedingungen. In den späteren Tabellen wird immer auf diese zurückverwiesen und nur das angeführt, worin sich die jeweiligen Versuchsansätze vom Normalversuch unterscheiden.

Siehe S. 70

Tabelle 3.

Wiederholbarkeit des Wertes bei pH 5,72.
(Frische Lösung.)

Versuchsbedingungen: Die gleichen wie Tabelle 2.

5,34	5,55	5,41	6,23	5,04	5,32
5,17	5,29	5,88	5,70	5,26	5,48

Die durchschnittliche Abweichung vom Mittelwert 5,47 ccm beträgt 0,24 ccm; nur ein einziger Wert (6,23) zeigt eine übergroße Abweichung.

Siehe S. 71

Tabelle 4.

Abhängigkeit der pH-Kurve vom Alter der Häminlösung.

Versuchsbedingungen: Wie Tabelle 2.

ph	Frische Lösung	$^1/_4$ Jahr alte Lösung	$1^1/_2$ Jahr alte Lösung
2,12	—	—	5,72
2,35	3,94	—	—
5,72	5,48	8,01	8,68
6,06	8,40	—	—
6,41	8,61	—	—
6,64	8,60	—	—
6,88	8,92	—	9,16
7,93	9,71	—	9,25

Tabelle 4a. Siehe S. 71

Einfluß des Kochens auf frische Häminlösung.

Versuchsbedingungen: Wie Tabelle 2.

pH	5,72	6,88	7,93
frische Lösung, ungekocht	5,48	8,75	9,71 ↑
frische Lösung, 3 Tage gekocht	8,71	8,48	8,27
frische Lösung, 7 Tage gekocht ↓	9,70	8,65	7,57
(gealterte Lösung	8,67	9,17	9,35)

Die Richtung der Pfeile läßt erkennen, daß durch das Kochen die Wirksamkeit der Häminlösung im sauren Gebiet zunimmt, während sie in alkalischer Lösung abnimmt.

Tabelle 5. Siehe S. 72

pH-Kurve der Jod-ion-katalase.

Versuchsbedingungen: 20 ccm 0,175n H_2O_2 + 10 ccm 0,42n KJ + 20 ccm $\frac{m}{5}$ Phosphat-Puffer; Reaktionsdauer 60 Min.; 0°. Jodometrische Bestimmung des nicht zersetzten H_2O_2 unter Zusatz von MoO_3 (gleichzeitig peroxydatisch verbrauchtes H_2O_2 wird zuerst bestimmt). Die Maßzahlen bedeuten $\frac{n}{10}$ Thiosulfat Minderverbrauch.

ph	4,6	6,37	6,80	6,90	6,98	7,10	7,50	8,10
	0,10	0,70	1,92	2,12	3,50	3,24	5,12	7,72

In ungepufferter Lösung 6,72, bei doppelter KJ-Konzentration 13,88.

Tabelle 6. Siehe S. 74

Temperaturkoeffizient der Häminwirkung.

Versuchsbedingungen: Wie Tabelle 2, pH 6,88; Versuchsdauer 30 Min., je 3 mg Hämin.

0°	10°	20°	30°
6,86	7,22	7,48	7,88

Tabelle 7. Siehe S. 74

Abhängigkeit vom Reaktionsvolumen.

Versuchsbedingungen: Wie Tabelle 2, pH 7,93, Reaktionsdauer 60 Min., je 3 mg Hämin.

100 ccm Reaktionsvolumen	9,48
200 ccm Reaktionsvolumen	9,42

Siehe S.75

Tabelle 8.

Einfluß der Häminmenge.

Versuchsbedingungen: Wie Tabelle 2, pH 5,72, Reaktionsdauer 60 Min.

3 mg Hämin	8,80
6 mg „	17,17
9 mg „	23,77

Siehe S. 75

Tabelle 8a.

Wie 8; Gabel. (Häminmenge × Reaktionsdauer konstant.)

Versuchsbedingungen: Wie Tabelle 2, pH 7,93.

Hämin mg	Zeit (Min.)	ccm $\frac{n}{10}$ $KMnO_4$ Minderverbrauch
3	60	9,42
6	30	12,68
9	20	14,43

Siehe S. 75

Tabelle 9.

Einfluß der H_2O_2-Menge (Gabel).

Versuchsbedingungen: Wie Tabelle 2, pH 7,93, je 3 mg Hämin.

10 ccm 0,17 n H_2O_2	120 Min.	8,76
20 ccm 0,17 n H_2O_2	60 „	9,42
40 ccm 0,17 n H_2O_2	30 „	10,12

Siehe S. 76

Tabelle 10.

Hemmbarkeit durch KCN.

Versuchsbedingungen: Wie Tabelle 2, Reaktionsdauer 60 Min., je 3 mg Hämin.

a) pH 5,72

KCN : Fe	KCN-Menge in mg	Versuch 1	Versuch 2	Mittel	Hemmung in %
—	0	8,80	8,55	8,68	—
16,7 : 1	5	8,01	7,85	7,93	8,5
167 : 1	50	7,41	6,95	7,18	17,1
1666 : 1	500	3,85	3,53	3,69	57,4

b) pH 6,88

—	0	9,25	9,09	9,17	—
16,7 : 1	5	8,13	7,93	8,03	12,4
167 : 1	50	7,58	7,47	7,53	17,8
1666 : 1	500	3,67	3,63	3,65	60,2

KCN : Fe	KCN-Menge in mg	Versuch 1	Versuch 2	Mittel	Hemmung in %
		c) pH 7,93			
—	0	9,01	9,27	9,14	—
16,7 : 1	5	8,59	9,01	8,80	3,7
167 : 1	50	6,49	6,09	6,29	31,2
1666 : 1	500	4,43	4,65	4,53	50,8

Tabelle 11. Siehe S. 78

Belichtungs- und Evakuierungsversuche.

Versuchsbedingungen: Wie Tabelle 2, pH 7,93, 60 Min., je 3 mg.

unbelichtet	(21°)	9,66	bei gewöhnlichem Druck	(0°)	8,20
belichtet	(21°)	10,68	bei 15 mm Hg	(0°)	7,93

Tabelle 12. Siehe S. 79/80

„Pyridinhämin". (Kinetik und Einfluß der Hämin-menge.)

Versuchsbedingungen: Wie Tabelle 2, pH 7,93.

	10 Min.	20 Min.	30 Min.	50 Min.	60 Min.
1 mg Hämin	3,74	5,25	6,30	8,70	9,62
2 mg „	7,53	10,84	13,04	16,61	17,76
3 mg „	10,84	15,51	18,97	21,34	23,08
5 mg „	16,38	22,43	26,82	29,65	32,06

Tabelle 12a. Siehe S. 80/81

Abfall der Geschwindigkeitskonstanten mit der Zeit. („Pyridinhämin".)

Die Geschwindigkeitskonstanten k_1, k_2, k_3, k_5 (die Indices bezeichnen die Zahl angewandter mg Hämin) ergeben sich aus den Werten der Tabelle 12 nach der Formel:

$$k = \frac{10^4}{t_2 - t_1} \cdot \log_{10} \frac{a - x_1}{a - x_2}$$

(t_1—t_2 ist das Reaktionsintervall, aus dem jeweils die Konstante berechnet wird.)

t_1—t_2	k_1	k_2	k_3	k_5
0—10 Min.	50,8	107,1	152,9	281.0
0—20 „	36,6	78,4	123,9	211,3
0—30 „	32,4	65,6	108,6	197,6
0—50 „	25,8	57,2	79,4	150,0
0—60 „	23,0	49,4	78,0	139,5

Siehe S. 81

Tabelle 12b.

Geschwindigkeitskonstanten und Häminmenge.

Berechnung wie Tabelle 12a („Pyridinhämin").

$t_1 - t_2$	0—10 Min.	10—50 Min.
k_1	50,8	19,5
k_2	107,1	44,7
k_3	152,9	61,0
k_5	281.0	117,3

Siehe S. 82/83

Tabelle 13.

pH-Kurve des „Pyridinhämins".

Versuchsbedingungen: Wie Tabelle 2, 60 Min., 3 mg Hämin.

ph	2,35	5,72	6,06	6,41	6,88	7,93
	10,40	22,43	18,88	14,30	10,13	7,31

Siehe S. 83

Tabelle 14.

Alterung des „Pyridinhämins".

Versuchsbedingungen: Wie Tabelle 2, pH 5,72, Reaktionsdauer 60 Min., 3 mg Hämin.

Hämin aus bayerischem Rinderblut		Hämin aus schweizerischem Rinderblut	
Tag des Auflösens	18,68	Tag des Auflösens	20,52
1 Tag nach dem Lösen	20,20	45 Tage nach dem Lösen	23,90
3 Tage „ „ „	22,30	90 Tage „ „ „	24,05
5 Tage „ „ „	23,08		
24 Tage „ „ „	23,09		

Siehe S. 84

Tabelle 15.

Nachträgliche Aktivierung des „Na_2HPO_4-hämins" durch Pyridin.

Versuchsbedingungen: Wie Tabelle 2, pH 5,72, Reaktionsdauer 60 Min., 3 mg Hämin.

„Na_2HPO_4-hämin"	„Na_2HPO_4-hämin" durch Zusatz v. 3 ccm 1,5%igem Pyridin zum Reaktionsgemisch aktiviert	„Pyridin-hämin"
8,40	11,59	23,08

Tabelle 16. Siehe S. 84

Einfluß der Pyridinmenge.

Versuchsbedingungen: Wie Tabelle 2, pH 5,72, 60 Min., 3 mg Hämin.

	%	%	%	%
Pyridingehalt der Häminlösung	1,5	2,5	15	100
Pyridingehalt des Reaktionsgemisches	0,0225	0,0375	0,0225	0,150
Minderverbrauch an ccm $\frac{n}{10}$ $KMnO_4$	23,08	25,66	17,91	12,00

Tabelle 17. Siehe S. 85

In Piperidin und Anilin aufgelöstes Hämin.

Versuchsbedingungen: Wie Tabelle 2, pH 5,72, Reaktionsdauer 10 Min., 3 mg Hämin.

Hämin in 100%igem Piperidin	Hämin in 100%igem Anilin	Hämin in 100%igem Pyridin	„Pyridinhämin"	„Na_2HPO_4-hämin"
2,83	0,64	5,80	10,84	3,68

Tabelle 18. Siehe S. 85/86

Abhängigkeit von der angewandten Hydroperoxydmenge.

Versuchsbedingungen: Wie Tabelle 2, pH 5,72, Reaktionsdauer 60 Min., 3 mg Hämin.

Angewandte Hydroperoxydmenge	Zersetzte H_2O_2-Menge in ccm $\frac{n}{10}$ $KMnO_4$ Minderverbrauch	Zersetzte H_2O_2-Menge in % der angewandten H_2O_2-Menge
5 ccm 0,17 n H_2O_2	8,25	95,7
10 ccm „ „	13,03	75,6
20 ccm „ „	23,08	67,0
40 ccm „ „	33,41	48,5
80 ccm „ „	40.98	29,7

Tabelle 19. Siehe S. 87/88

Kinetik der Katalaseversuche in 75%igem Pyridin.

Versuchsbedingungen: Das Reaktionsvolumen von 25 ccm enthält 20 ccm reines Pyridin, die angegebene Katalysatormenge in reinem Pyridin gelöst und 5 ccm 0,085 n H_2O_2 (H_2O_2-Konzentration im Reaktionsgemisch 0,017 n). Zu den angegebenen Zeiten werden 5 ccm

herauspipettiert und mit $\frac{n}{100}$ $KMnO_4$ titriert; die Maßzahlen bedeuten ccm $\frac{n}{100}$ $KMnO_4$ Minderverbrauch.

t in Min.	0,6 mg Hämin	1,8 mg Hämin	1,8 mg Hämin (mit H_2O_2 vorbehandelt)
5	—	3,10	0,43
10	0,40	4,22	0,69
15	0,64	5,02	1,19
20	0,87	—	—
30	—	6,10	2,04
45	1,62	6,91	2,49
60	—	7,56	2,82
90	—	7,96	—
150	—	—	3,56
300	—	—	3,82

Tabelle 20—31 bezieht sich auf Peroxydasewirkungen, was nicht jeweils besonders vermerkt wird.

Siehe S. 91

Tabelle 20.

Abhängigkeit der Leerreaktion von der H_2O_2-Konzentration.

Versuchsbedingungen: 20 ccm 0,17 n H_2O_2 + 10 ccm 0,42 n KJ + 20 ccm $\frac{m}{5}$ Phosphatpuffer zu 200 ccm, pH 5,72, 0°, die Kolonne 2 ist unter diesen Bedingungen ausgeführt (Normalbedingung der Leerreaktion), die andern Kolonnen mit den angegebenen H_2O_2-Mengen. Die Maßzahlen bedeuten ccm $\frac{n}{10}$ $Na_2S_2O_3$.

Zeit in Min.	10 ccm	20 ccm	40 ccm	80 ccm	160 ccm	0,17 n H_2O_2
10	0.40	0,76	1,61	3,13	5,88	
20	0,71	1,46	3,01	5,86	11,18	
30	1,02	2,12	4,33	8,52	16,20	
40	1,38	2,77	5,72	11,06	20,82	
50	1,63	3,44	6,97	13,57	24,90	
60	1,98	4,13	8,22	16,03	28,40	

Siehe S. 91

Tabelle 20a.

Abhängigkeit der Leerreaktion von der KJ-Konzentration.

Versuchsbedingungen: Wie Tabelle 20, pH 5,72.

Zeit in Min.	2,5 ccm	5 ccm	10 ccm	20 ccm	0,42 n KJ
10	0,22	0,38	0,76	1,48	
20	0,38	0,74	1,46	2,82	
30	0,55	1,08	2,12	4,08	
40	0,71	1,43	2,77	5,33	
50	0,90	1,75	3,44	6,50	
60	1,10	2,07	4,13	7,60	

Tabelle 21. Siehe S. 91 u. 95

Abhängigkeit der Leerreaktion vom Reaktionsvolumen.

Versuchsbedingungen: Wie Tabelle 20, pH 5,72.

Zeit (Min.)	100 ccm	200 ccm Reaktionsvolumen
10	1,30	0,76
20	2,53	1,46
30	3,60	2,12

Tabelle 22. Siehe S. 91/92

pH-Abhängigkeit der Leerreaktion.

Versuchsbedingungen: Wie Tabelle 20.

Zeit (Min.)	pH 2,12	2,35	5,72	6,88	7,30	7,93
10	0,98	0,83	0,76	0,78	0,72	(0,09)
20	1,82	1,59	1,46	1,50	1,22	(0,15)
30	2,26	2,29	2,12	2,17	1,89	(0,18)
40	3,41	3,02	2,77	2,80	2,39	(0,23)
50	4,12	3,69	3,44	3,45	2,90	(0,26)
60	4,80	4,34	4,13	4,06	3,39	(0,29)

Die folgenden Werte ergeben sich bei Anwendung von 20 ccm $\frac{m}{5}$ Acetatpuffer, anstatt mit $\frac{m}{5}$ Phosphatpuffer. Siehe S. 98

Zeit (Min.)	pH 3,57	4,26	4,46
5	0,50	0,46	0,48
10	0,93	0,88	0,87
15	1,32	1,22	1,25

Tabelle 23. Siehe S. 93/94

pH-Kurve der Hämin-peroxydasewirkung.

Versuchsbedingungen: Wie Tabelle 20, nur außerdem noch 3 mg Hämin. Die Zahlen sind die Differenzen zwischen Katalysator und Leerreaktion in ccm $\frac{n}{10}$ $Na_2S_2O_3$.

Zeit (Min.)	pH 2,12	2,35	2,90	5,06	5,72	6,00	6,41	6,88	7,30	7,93
10	0,03	0,13	0,15	0,48	0,62	0,60	0,60	0,29	0,23	0,05
20	0,11	0,21	0,31	0,95	1,06	0,86	0,76	0,56	0,36	0,09
30	0,16	0,32	0,35	1,41	1,43	1,27	1,03	0,72	0,48	0,13
40	0,21	0,34	0,41	1,68	1,79	1,55	1,23	0,82	0,59	0,15
50	0,33	0,44	0,50	1,98	2,01	1,78	1,33	0,95	0,59	0,17
60	0,49	0,51	0,58	2,05	2,19	1,90	1,42	1,08	0,67	0,21

Siehe S. 98

Bei Verwendung von 20 ccm $\frac{m}{5}$ Acetatpuffer an Stelle der Phosphatpuffer erhält man folgende Werte:

Zeit (Min.)	pH 3,57	4,26	4,46
10	0,73	0,80	0,85
15	1,00	1,16	1,21

Siehe S. 94

Tabelle 24.

Temperaturkoeffizient der Leerreaktion.

Versuchsbedingungen: Wie Tabelle 20, pH 5,72.

Zeit (Min.)	0°	10°	20°	30° Celsius
10	0,76	1,52	3,76	6,22
20	1,46	2,94	6,96	10,20
30	2,12	4,32	9,50	12,96

Siehe S. 94

Tabelle 24a.

Temperaturkoeffizient der Hämin-peroxydase.

Versuchsbedingungen: Wie Tabelle 20, 3 mg Hämin, pH 5,72. Die Zahlen sind die Differenzen zwischen Katalysator- und Leerversuch.

Zeit (Min.)	0°	10°	20° Celsius
10	0,62	0.98	0,08
20	1,06	1,34	0,03
30	1,43	1,56	0,07

Siehe S. 95

Tabelle 25.

Einfluß des Reaktionsvolumens auf die Häminwirkung.

Versuchsbedingungen: Wie Tabelle 20, pH 5,72, 3 mg Hämin. Die Zahlen bedeuten wieder die Differenzen.

Zeit (Min.)	100 ccm	200 ccm Reaktionsvolumen
10	1,28	0,62
20	2,04	1,06
30	2,61	1,43

Tabelle 26. Siehe S. 95

Einfluß der Häminmenge.

Versuchsbedingungen: Wie Tabelle 20, pH 6,88; die Zahlen bedeuten wieder die Differenzen (wie Tabelle 23).

Zeit (Min.)	1,5 mg	3 mg	6 mg Hämin
10	0,14	0,29	0,74
20	0,24	0,56	0,92
30	0,33	0,72	1,39
40	0,43	0,82	1,58
50	0,48	0,95	1,78
60	0,53	1,08	1,84

Tabelle 27. Siehe S. 96

Einfluß der H_2O_2-Menge auf die Häminmenge.

Versuchsbedingungen: Wie Tabelle 20, pH 5,72, 3 mg Hämin. Die Zahlen bedeuten wieder die Differenzen. (Wie Tabelle 23.)

Zeit (Min.)	10 ccm	20 ccm	40 ccm	80 ccm	160 ccm	0,17 n H_2O_2
5	0,26	0,36	0,46	0,78	1,26	
15	0,67	1,04	1,47	2,02	2,52	
30	1,28	1,81	2,46	2,67	2,63	
60	2,05	2,88	3,33	3,07	1,62	

Tabelle 28. Siehe S. 97

Einfluß der KJ-Menge auf die Häminwirkung.

Versuchsbedingungen: Wie Tabelle 20, pH 5,72, 3 mg Hämin. Die Zahlen bedeuten wieder Differenzen.

Zeit (Min.)	2,5 ccm	5 ccm	10 ccm	20 ccm	0,42 n KJ
5	0,26	0,32	0,36	0,44	
15	0,60	0,86	1,04	1,11	
30	1,12	1,47	1,81	1,97	
60	1,70	2,42	2,88	2,78	

Tabelle 29. Siehe S. 98

Einfluß von Neutralsalzen auf die Hämin-peroxydase.

Versuchsbedingungen: Wie Tabelle 20, pH 5,72, 3 mg Hämin. Die angegebenen Zahlen sind Stundenwerte (Differenzen).

ohne NaCl	mit 0,25 g NaCl	mit 2,5 NaCl im Reaktionsgemisch
2,19	2,64	2,62

Siehe S. 98

Tabelle 30.

Vergiftungsversuche am Hämin.

Versuchsbedingungen: Wie Tabelle 20, pH 5,72, 3 mg Hämin. Stundenwerte (Differenzen).

ohne Zusatz	mit 10 mg $K_4P_2O_7$	mit 5 mg KCN	im Reaktionsgemisch
2,19	2,21	2,14	

Siehe S. 99

Tabelle 31.

Peroxydasewirkung des „Pyridin-hämins".

Versuchsbedingungen: Wie Tabelle 20, pH 5,72, 3 mg Hämin. Die Zahlen bedeuten Differenzen zwischen Katalysator- und Leerversuch.

10 Min.	3,16	(0,62)
20 Min.	4,92	(1,06)
30 Min.	6,31	(1,43)
40 Min.	6,90	(1,79)
50 Min.	7,52	(2,01)
60 Min.	7,92	(2,19)

Die Zahlen in Klammern geben zum Vergleich die Werte für „Na_2HPO_4-hämin" bei denselben Bedingungen wieder.

Siehe S. 99/100

Tabelle 32.

Gleichzeitige peroxydatische und katalatische Wirkungen des Hämins.

Versuchsbedingungen: Wie in Tabelle 20, pH 5,72, Stundenwerte, 3 mg Hämin.

Freigemachte Jodmenge		katalatische Katalysatorwirkung
6,30		4,40
Leerreaktion	peroxydatische Katalysatorwirkung	(Parallelversuch ohne KJ)
4,11	2,19	8,80

Tabelle 33. Siehe S. 101

Schädigungsversuche (Peroxydasewirkungen).

Sämtliche Versuche bei pH 5,72.

I.	II.	III.	IV.
Katalasewirkung in 1 Std. (Reaktionsbedingungen wie in Tab. 2, Reaktionsvolumen 190 ccm)	Peroxydasewirkung unter Versuchsbedingung wie in Tab. 20 (3 mg Hämin, die 60 Min. mit H_2O_2 vorbehandelt)	Peroxydasewirkung als Vergleich zu II, Versuchsbedingung 20, 3 mg Hämin, 14,94 ccm H_2O_2	Leerversuch zu II u. III, Reaktionsbedingung 20, 14,94 ccm H_2O_2
8,60	4,50	4,76	2,76
d.h. 25,3% des H_2O_2 sind in 1 Stunde zersetzt worden	Differenz gegenüber IV: 1,74	Differenz gegenüber IV: 2,00	

Tabelle 33a. Siehe S. 101

Schädigungsversuche (Katalasewirkungen).

Versuchsbedingungen: Wie Tabelle 2.

1. 3 mg „Na_2HPO_4-hämin" 180 ccm Reaktionsvolumen, 50 Stunden, 0°, pH 7,93 — 27,28
2. Wie 1, nur 20° — 20,13
3. Zu Versuch 1 erneut 20 ccm H_2O_2 zugegeben; Versuchsbedingungen wie Tabelle 2, 0°, 60 Min., pH 7,93 — 0,12
4. Zu Versuch 2 erneut 20 ccm H_2O_2 zugegeben, sonst wie 3 — 0,15
5. 3 mg „Pyridin-hämin", pH 5,72, sonst wie 1 — 34,82
6. wie 5, nur 20° — 34,94
7. Zu Versuch 5 erneut 20 ccm H_2O_2 zugegeben, Versuchsbedingungen 2, 0°, 60 Min., pH 5,72 — 9,16
8. Zu Versuch 6 erneut 20 ccm H_2O_2 zugegeben, sonst wie 7 — 0,57

Tabelle 34. Siehe S. 103/104

Peroxydasewirkung des Mesohämins.

Versuchsbedingungen: Wie Tabelle 20, 3 mg Mesohämin. Die Zahlen bedeuten Differenzen zwischen Katalysator- und Leerversuch.

Zeit (Min.)	ph	5,72	6,41	6,88	7,30	7,93
10		0,02	0,89	0,64	0,42	0,43
20		0,11	1,04	0,91	0,62	0,69
30		0,21	1,11	1,04	0,69	0,89
40		0,29	1,30	1,30	0,89	0,93
50		0,40	1,44	1,51	1,09	0,95
60		0,60	1,54	1,60	1,14	0,96

Siehe S. 104/105

Tabelle 35.

Vergleich von Hämin, Dihydrohämin und Mesohämin als Katalasen in wässerigem Medium.

Versuchsbedingungen: Wie Tabelle 2, jeweils 3 mg Katalysator, in 2,5%igem Pyridin gelöst, pH 5,72.

Zeit (Min.)	Hämin	Dihydrohämin	Mesohämin
10	12,41	10,76	1,36
15	17,71	15,50	6,24
30	21,53	18,11	9,18

Siehe S. 105/106

Tabelle 36.

Vergleich von Hämin, Dihydrohämin und Mesohämin als Katalasen in 75%igem Pyridin.

Versuchsbedingungen: Wie Tabelle 19, 0,6 mg Katalysator.

Zeit (Min.)	Hämin	Dihydrohämin	Mesohämin
5	—	0,25	2,05
10	0,40	1,39	3,38
15	0,64	2,01	3,88

Siehe S. 106

Tabelle 36a.

Vergleich von Hämin, Dihydrohämin und Mesohämin als Katalasen in 75%igem Pyridin.

Versuchsbedingungen: Wie Tabelle 19, jeweils 1,8 mg Katalysator.

Zeit (Min.)	Hämin	Dihydrohämin	Mesohämin	„Perhydrohämin“
5	3,25	5,78	6,49	—
10	4,39	7,59	7,69	0,04
15	5,14		8,47	0,07
30	6,10			
45	6,90			
60	7,56			
90	7,96			
960	8,56			

Tabelle 37. Siehe S. 107

Vergleich von Häminen verschiedener Herkunft als Katalasen.

Versuchsbedingungen: Wie Tabelle 2, 3 mg Katalysator in $\frac{m}{50}$ Na_2HPO_4 Stundenwerte.

pH	5,72	6,88	7,93
Bayerisches Rind	5,48	8,75	9,71
Schweizer Rind	5,51	9,21	9,71
Schweizer Pferd	5,26	8,66	9,00
Schweizer Schwein	5,48	9,06	9,50

Tabelle 37a. Siehe S. 107

Vergleich von Häminen verschiedener Herkunft als Katalasen.

Versuchsbedingungen: Wie Tabelle 2, jeweils 3 mg Katalysator in 1,5%igem Pyridin gelöst, pH 5,72.

Zeit (Min.)	Bayerisches Rind	Schweizer Rind	Schweizer Pferd	Schweizer Schwein
10	10,30	10,12	10,84	12,49
15	14,13	14,27	—	—
30	18,60	18,89	18,97	20,18
60	22,89	22,43	22,97	24,10

Tabelle 38. Siehe S. 108

Vergleich von Chlor-, Brom-, Jod- und Rhodanhämin als Katalase.

Versuchsbedingungen: Wie Tabelle 2, pH 5,72, 10 Min.-Werte, die 3 mg Hämin entsprechende in reinem Pyridin gelöste Katalysatormenge.

Chlor-	Brom-	Jod-	Rhodan-Hämin
5,84	6,04	6,15	5,77

Tabelle 38a. Siehe S. 108 (Anm. 239)

Vergleich von Chlor- und Bromhämin als Katalasen.

Versuchsbedingungen: Wie Tabelle 2, pH 5,72, 3 mg (bzw. die entsprechende Menge) in 1,5%igem Pyridin gelöstem Katalysator.

Zeit (Min.)	Chlorhämin	Bromhämin
10	10,94	14,67
15	14,20	17,92
30	19,18	26,35
60	23,08	26,88

Siehe S. 109

Tabelle 39.

Vergleich von Hämin und Hämatin als Katalasen.

Versuchsbedingungen: Wie Tabelle 2, 3 mg Katalysator (bzw. die entsprechende Menge) in $\frac{m}{50}$ Na_2HPO_4 gelöst.

pH	Hämin (frisch dargestellte Lösung)	Hämatin
2,35	3,94	4,94
5,72	5,48	7,77
6,88	8,75	10,06
7,93	9,71	10,11

Siehe S. 111/112

Tabelle 40.

Peroxydasewirkung des Ferro-ions.

Versuchsbedingungen: Wie Tabelle 20, pH 5,72, 15 mg $FeSO_4$, $7H_2O$. (Differenzen.)

Zeit (Min.)	ausgeschiedenes Jod	
2	0,50	(0,18)
5	0,52	(0,37)
10	0,51	(0,62)
20	0,52	(1,06)
30	0,51	(1,43)
40	0,48	(1,79)
50	0,51	(2,01)
60	0,50	(2,19)

Die Zahlen in der Klammer geben zum Vergleich die Wirkung von 3 mg Hämin. (Die Eisenmenge im Ferrosulfatversuch ist 11,7 fach so groß wie im Häminversuch.)

Siehe S. 117

Tabelle 41.

pH-Kurve des HbO_2.

Versuchsbedingungen: Wie in Tabelle 20, 10,4 mg HbO_2, Stundenwerte. (Differenzen.)

pH	2,12	2,35	3,55	4,15	4,50	4,90	5,10
Versuch I	1,65	0,69	0,44	0,78	1,60	3,70	3,47
Versuch II	1,65	0,82	—	—	—	—	3,77
pH	5,60	6,10	6,40	6,80	7,05	7,30	8,30
Versuch I	3,95	4,01	3,78	2,13	1,30	0,90	0,01
Versuch II	4,10	—	3,97	2,04	—	—	0,03

Tabelle 41a. Siehe S. 118

pH-Kurve des HbO_2 (fortlaufend titriert).

Versuchsbedingungen: Wie Tabelle 20, 235 mg HbO_2. (Differenzen.)

Zeit (Min.)	ph 2,12	2,35	3,55	4,15	4,50	5,10	6,40	6,80	7,30	8,30
2	—	—	0,26	1,46	7,25	3,20	1,35	0,54	0,51	0,18
4	—	—	0,48	2,44	8,86	5,03	1,76	0,84	1,04	0,29
6	—	—	0,57	3,24	9,44	7,08	2,39	0,88	1,43	0,38
8	—	—	0,84	3,90	11,64	8,60	3,10	0,89	1,71	0,43
10	—	—	0,95	4,30	12,59	9,54	3,56	1,20	2,04	0,50

Tabelle 41b. Siehe S. 120

pH-Kurve des HbO_2 (Purpurogallin-methode).

Versuchsbedingungen: 5 g Pyrogallol + 20 ccm $\frac{m}{5}$ Phosphatpuffer + 20 ccm 0,17n H_2O_2 + 52 mg HbO_2 zu 200 ccm, 0°, Reaktionsdauer 60 Minuten.

pH	2,12	5,20	6,80	8,30
Schichtdicken im Colorimeter	70	50	58	64
Relative Wirksamkeit	71	100	86	78

Tabelle 42. Siehe S. 121

Einfluß der HbO_2-Menge.

Versuchsbedingungen: Wie Tabelle 20, pH 5,05, fortlaufend titriert. (Differenzen.)

Zeit (Min.)	117,5 mg	235 mg HbO_2
2	1,62	3,20
4	2,99	5,03
6	3,68	7,08
8	4,30	8,60
10	4,77	9,54

Tabelle 43. Siehe S. 122

Einfluß der H_2O_2-Menge.

Versuchsbedingungen: Wie Tabelle 20, 235 mg HbO_2, fortlaufend titriert, pH 5,05. (Differenzen.)

Zeit (Min.)	10 ccm	20 ccm	40 ccm 0,17 n H_2O_2
2	1,23	3,20	—
4	2,44	5,03	10,42
6	3,29	7,08	13,20
8	4,31	8,60	14,90
10	4,92	9,54	15,71

Siehe S. 122

Tabelle 44.

Einfluß der KJ-Menge.

Versuchsbedingungen: Wie Tabelle 20, 235 mg HbO_2, fortlaufend titriert, pH 5,05. (Differenzen.)

Zeit (Min.)	5 ccm	10 ccm	20 ccm	40 ccm 0,42 n KJ
2	3,23	3,20	3,20	3,20
4	5,30	5,03	5,20	5,15
6	6,74	7,08	6,44	6,49
8	7,38	8,10	8,02	7,72
10	8,18	9,04	8,84	8,75

Siehe S. 123

Tabelle 45.

Kohlenoxyd-hämoglobin als Peroxydase.

Versuchsbedingungen: Wie Tabelle 20. Die den HbO_2-Mengen der vorigen Versuche entsprechende HbCO-Menge, fortlaufend titriert. (Differenzen.)

Zeit (Min.)	pH 5,05		pH 6,88	
2	3,41	(3,20)	0,83	(0,54)
4	6,37	(5,03)	1,10	(0,84)
6	—	—	—	
8	9,48	(8,60)	—	
10	10,44	(9,54)	1,93	(1,20)

In Klammern die entsprechenden HbO_2-Werte.

Siehe S. 123/124

Tabelle 46.

pH-Kurve der pflanzlichen Peroxydase.

Versuchsbedingungen: Wie Tabelle 20, 0,9 mg Peroxydase von der Purpurogallinzahl 540; fortlaufend titriert. (Differenzen.)

Zeit (Min.)	pH	2,12	2,90	*3,50	*4,20	*4,60	5,20	6,80	7,25	8,10
2		0,21	2,35	0,15	0,73	2,94	0,73	0,16	0,10	0,10
10		0,22	3,40	0,21	1,04	4,37	0,80	0,17	0,17	0,21
15		0,29	4,30	0,23	1,46	5,55	0,91	0,25	0,22	0,22

(Die mit einem *) bezeichneten pH-Punkte sind mit $\frac{m}{5}$ Acetatpuffern eingestellt.)

B. Einige analytische Angaben.

In folgendem seien kurz die wichtigsten Analysen der verschiedenen Blutfarbstoffderivate zusammengestellt. Bei den Häminpräparaten wurde das Eisen und der Halogengehalt durch Aufschluß mit Magnesium-superoxyd[289]) und Titration bestimmt.

Substanz	Einwage	ccm $\frac{n}{20}$ $KMnO_4$	ccm $\frac{n}{10}$ $AgNo_3$	Fe %	Cl %
Chlorhämin aus bayer.	0,4004 g	12,50	6,25	8,72	5,53
Rinderblut	0,3998 g	12,39	6,25	8,65	5,54
Chlorhämin aus schweiz.	0,4008 g	12,32	6,40	8,58	5,66
Rinderblut	0,3999 g	12,38	6,34	8,64	5,62
Chlorhämin aus schweiz.	0,4000 g	12,37	6,15	8,63	5,43
Schweineblut	0,4000 g	12,46	6,12	8,70	5,45
Chlorhämin aus schweiz.	0,4005 g	12,30	6,39	8,58	5,65
Pferdeblut	0,4004 g	12,35	6,31	8,61	5,58
Dihydrohämin	0,3958 g	—	6,36	—	5,69
	0,3983 g	11,92	—	8,35	—
Bromhämin aus schweiz.	0,4001 g	11,64	5,75	8,12	11,48 % Br
Rinderblut	0,4007 g	11,54	5,77	8,06	11,53 % Br
Berechnet für Chlorhämin	$C_{34}H_{30}O_4N_4FeCl$			8,60 % Fe	5,46 % Cl
Berechnet für Dihydrohämin	$C_{34}H_{32}O_4N_4FeCl$			8,60 % Fe	5,44 % Cl
Berechnet für Bromhämin	$C_{34}H_{30}O_4N_4FeBr$			8,05 % Fe	11,61 % Cl

Molekulargewichtsbestimmung des Dihydro-hämins nach H. Carlsohn[290]):

1,022 mg Sbst. in 71,44 mg Campher: $\Delta = 1{,}0^0 \pm 0{,}2^0$.
1,55 mg Sbst. in 80,32 mg Campher: $\Delta = 1{,}3^0 \pm 0{,}2^0$.
$C_{34}H_{32}O_4N_4FeCl$ Ber.: M.G. 652. Gef.: M.G. 600 ($\pm$ 120)
610 ($\pm$ 90)

Der Eisengehalt der HbO_2-Lösung I (verwendet zu der Peroxydase-pH-Kurve ohne Ausschaltung der Jodschädigung) wurde nach der von R. Willstätter[291]) ausgearbeiteten Rhodanidmethode kolorimetrisch bestimmt; für alle kolorimetrischen Bestimmungen diente das große Kolorimeter von Leitz, Wetzlar. Die durch Veraschung nach A. Neu-

---

[289]) Ausführlich beschrieben in der Diplomarbeit von A. Monsch, Quantitative Bestimmung von Eisen und Halogen in Häminen; Eidgen. T. H., Zürich, November 1926.
[290]) B. **60**, 473 (1927).
[291]) B. **53**, 1152 (1920).

mann[292]) und nachheriges Auffüllen auf das fünffache verdünnte HbO_2-Lösung wurde mit einer $3{,}5816 \cdot 10^{-5}$ $Fe^{\cdots}$-Lösung verglichen.

	Veraschte Blutfarbstofflösung	Vergleichslösung
Relative Schichtdicke	50	57
„ „	30	36
„ „	60	72

Es errechnet sich daraus ein Eisengehalt von 0,0118 mg Fe pro ccm. Das heißt, daß pro Versuch (3 ccm) 10,4 mg HbO_2 angewandt wurden.

Der Eisengehalt der HbO_2-Lösung II (verwendet zu den Purpurogallinversuchen) wurde ebenfalls mit der Rhodanid-methode bestimmt. Die HbO_2-Lösung war durch das Veraschen und das Auffüllen auf das $\frac{50}{3}$fache verdünnt worden. Als Vergleichslösung diente dieselbe Eisenlösung wie oben.

	Veraschte Blutfarbstofflösung	Vergleichslösung
Relative Schichtdicke	30	62
„ „	40	78
„ „	20	38

Es errechnet sich daraus ein Eisengehalt von 0,059 mg Fe pro ccm, woraus folgt, daß pro Versuch (3 ccm) 52 mg HbO_2 angewandt wurden.

Bei der HbO_2-Lösung III (verwendet für die HbO_2 peroxydase pH-Kurve, unter Ausschaltung der Jodschädigung und für sämtliche übrigen Versuche ohne Jodschädigung) wurde die Eisenbestimmung kolorimetrisch mit Sulfo-salicyl-säure nach L. Lorber[293]) durchgeführt, die den Vorteil gegenüber der Rhodanidmethode hat, daß sie nicht in so hohem Maße von der genauen Einhaltung bestimmter Bedingungen abhängig ist. Es wurde die bei der Veraschung und nachfolgendem Auffüllen auf das 40fache verdünnte HbO_2-Lösung mit einer $\frac{5}{60\,000}$ m Eisenlösung verglichen.

	Veraschte Blutfarbstofflösung	Vergleichslösung
Relative Schichtdicke	80	70
„ „	90	76
„ „	60	54

außerdem wurde die bei der Veraschung und nachfolgendem Auffüllen nur auf das 20fache verdünnte HbO_2-Lösung (andere Analyse) mit einer $\frac{12}{60\,000}$ m Eisenlösung verglichen.

---

[292]) H. **37**, 115 (1902) und H. **43**, 32 (1904/05).
[293]) Bio.Z. **181**, 391 (1927).

	Veraschte Blutfarbstofflösung	Vergleichslösung
relative Schichtdicke	58	50
" "	80	67
" "	90	74

Die erste Bestimmungsreihe gibt einen Mittelwert von 0,163 mg Fe pro ccm, die zweite von 0,188 mg Fe pro ccm. Da die Bestimmungen nach dieser Methode leicht zu hoch ausfallen, so habe ich als wahrscheinlichen Wert 0,16 mg Fe pro ccm in die weiteren Rechnungen eingesetzt; es ergibt sich dann, daß in den Versuchen (5 ccm Katalysatorlösung) 235 mg HbO_2 verwandt wurden.

C. pH- und pCl-Messungen.

Die pH-Angaben der Tabellen über die katalytischen Wirksamkeiten beziehen sich auf die folgenden elektrometrischen Messungen. Zwischenwerte wurden gegebenenfalls durch Interpolation unter Zuhilfenahme der im W. M. Clark „Determination of Hydrogen Ions", Seite 114/15 gegebenen Tabelle errechnet.

Die Lösungen, an denen die pH-Messungen vorgenommen wurden, hatten genau dieselbe Zusammensetzung, wie die der Hämin-peroxydaseversuche, nur daß H_2O_2 weggelassen worden war. Als Gegenelektrode diente eine gesättigte Kalomel-elektrode, Meßtemperatur 25°. Es ergaben sich für die verschiedenen Lösungen folgende Werte:

$\frac{m}{5}$ H_3PO_4	$\frac{m}{5}$ KH_2PO_4	$\frac{m}{5}$ Na_2HPO_4	Millivolt	pH
10	—	—	373	2,12
7,5	2,5	—	377	2,20
5	5	—	385,5	2,35
2,5	7,5	—	417	2,90
0,5	9,5	—	541	5,06
—	10	—	579	5,72
—	7,5	2,5	618,5	6,41
—	5	5	646	6,88
—	2,5	7,5	670	7,30
—		10	710	7,92

$\frac{m}{5}$ CH_3COOH	$\frac{m}{5}$ CH_3COONa		
9,5	0,5	455	3,57
7,5	2,5	494	4,26
5	5	507	4,46

Um festzustellen, ob die Bindungsart des Chlors bei frisch hergestellter und gealterter Häminlösung voneinander verschieden ist, wurde

der Chlor-ionen-gehalt der Lösungen nach L. Michaelis[294]) elektrometrisch bestimmt. Die verwandten Lösungen waren $\frac{m}{50}$ an Na_2HPO_4 (dieselben wie zu den katalytischen Versuchen); die eine Lösung war frisch hergestellt, die andere 5 Monate alt. Außerdem wurde zur Kontrolle, ob der Na_2HPO_4-Gehalt der Lösungen von Einfluß auf die Messungen ist, eine $\frac{m}{650}$ KCl-Lösung, die $\frac{m}{50}$ an Na_2HPO_4 war, gemessen, überdies noch eine Lösung, die sowohl $\frac{m}{650}$ an Hämin, als auch $\frac{m}{650}$ an KCl und $\frac{m}{50}$ an Na_2HPO_4 war. Als Gegen-elektrode diente eine gesättigte Kalomel-elektrode; Meßtemperatur 18°.

Lösung	Art des Hämins	Millivolt	pCl gef.	pCl ber.
1) $\frac{m}{650}$ Hämin + $\frac{m}{50}$ Na_2HPO_4	Frische Hämin-lösung	177	2,46	2,81
2) $\frac{m}{650}$ Hämin + $\frac{m}{50}$ Na_2HPO_4	Gealterte Hämin-lösung	165,8	2,27	2,81
3) $\frac{m}{650}$ KCl + $\frac{m}{50}$ Na_2HPO_4	—	186,3	2,62	2,81
4) $\frac{m}{650}$ Hämin + $\frac{m}{650}$ KCl + $\frac{m}{50}$ Na_2HPO_4	Gealterte Hämin-lösung	157	1,96	2,51

Alle gemessenen pCl-Werte sind kleiner als die theoretisch errechneten, d. h. die gefundene Chlor-ionen-konzentration ist größer, als die zu erwartende. Das wird wahrscheinlich durch den Gehalt der Lösungen an Na_2HPO_4 und Hämatin bedingt. (Der Hämatingehalt bewirkt, daß in den Versuchen 1, 2 und 4 die Abweichungen von den theoretischen Werten noch größer sind als im hämatinfreien Versuch 3. Da aber im Versuch 4 die ganze Chlormenge, die mehr enthalten ist als im Versuch 2, gefunden wird (theoretische pCl-Differenz 0,30, gefundene 0,31), so deutet das darauf hin, daß einerseits in der 5 Monate alten Häminlösung nahezu alles Chlor als Ion enthalten ist, andererseits errechnet sich für die frische Häminlösung aus der pCl-Differenz gegenüber der gealterten (0,19), daß in ihr nur etwa 64% des Chlors in ionogener Form vorliegt.

---

[294]) Praktikum der physikal. Chemie, Berlin 1926, S. 163.

Kurze Zusammenfassung der wichtigsten Ergebnisse der Arbeit.

1. Die katalatischen und peroxydatischen Wirksamkeiten der Blutfarbstoffderivate sind nicht direkt proportional ihrem Eisengehalt, sondern stark verschieden bei gleichem Eisengehalt, es scheinen vielmehr Beziehungen zwischen Konstitution und katalytischer Wirksamkeit zu herrschen.

2. Oxyhämoglobin ist nur peroxydatisch wirksam, nicht auch katalatisch.

3. Hämin zeigt Katalase- und Peroxydasewirkung zugleich.

4. Die Katalase- und Peroxydasewirkung des Hämins wird durch seine Auflösung in verdünntem Pyridin stark gesteigert; die dabei entstehende Verbindung ist trotz des nahezu gleichen Absorptionsspektrums nicht Hämochromogen.

5. Die eisenfreien Blutfarbstoffderivate (Porphyrine) sind katalatisch und peroxydatisch unwirksam: ebenso das Mangan-mesohämin.

6. Sämtliche untersuchten komplexen synthetischen Eisenverbindungen sind bei gleichem Eisengehalt ungleich schwächere Katalasen und Peroxydasen, als die eisenhaltigen Blutfarbstoffderivate. Bei der peroxydatischen Jodwasserstoffoxydation zeichnet sich das Ferro-ion, wie auch sonst, durch das Hervorrufen eines schnell abklingenden Oxydationsstoßes aus.

7. Es wurden gemeinsam mit Herrn C. Seyffert zwei neue Reduktionsprodukte des Hämins aufgefunden, das Dihydro-hämin und das „Perhydro-hämin", deren Löslichkeitseigenschaften, Absorptionsspektren und katalytischen Eigenschaften beschrieben werden.

8. Die Eigenschaften des Dihydro-hämins lassen sich mit der Küsterschen Häminformel zwangloser vereinbaren als mit der Fischerschen.

9. Die Jodwasserstoffoxydation durch Hydroperoxyd läßt sich, sowohl was die pH-Abhängigkeit in Abwesenheit von Katalysatoren, als auch die Art ihrer Beschleunigung durch die Blutfarbstoffderivate betrifft, durch die Dehydrierungstheorie, wie wahrscheinlich alle peroxydatischen Reaktionen, nur bei Zuhilfenahme von zusätzlichen Annahmen erklären.

10. Die äußerst geringe Hemmbarkeit der katalatischen Wirksamkeit des Hämins durch Blausäure beweist, daß nicht alle Eisenkatalysen, so wie es Warburg verlangt, durch Blausäure vergiftet werden.

11. Die Ausmessung der Absorptionsspektren genügt nicht zur Charakterisierung von Blutfarbstoffderivaten, da nichtidentische Verbindungen unter Umständen identische Absorptionsspektren haben. Das gleiche gilt auch für die kristallographischen Eigenschaften (Auslöschungsschiefen).

12. In dem von mir untersuchten Beispiel (Hämin und Blausche Verbindung) trifft die Hypothese von Baudisch und Welo zu, daß katalytische Wirksamkeit und Paramagnetismus Hand in Hand gehen.

Nachwort.

Diese Arbeit wurde am 1. Juli 1927 abgeschlossen und berücksichtigt daher auch nur die bis dahin erschienene Literatur. In der bis zur Drucklegung — 1. April 1928 — verstrichenen Zeit sind eine große Zahl wichtiger Arbeiten auf den verschiedenen, von dieser Arbeit berührten Gebieten erschienen. Ich erwähne nur die wichtigen Arbeiten von Hans Fischer über die Porphyrine, von denen ich nur die ersten berücksichtigen konnte; ferner die hochinteressanten neueren Arbeiten von F. Haurowitz über die Konstitution des Hämins, die zum Teil neue Gesichtspunkte für die Deutung des in dieser Arbeit so oft erwähnten dritten aktiven Wasserstoff-Atoms des Hämins bringen. Über die katalatische Wirksamkeit des Hämins ist eine sehr interessante Arbeit von H. v. Euler erschienen, ferner von S. M. Maximowitsch und E. S. Awtonomowa eine Arbeit über Blutkatalasen, die die Zerstörung des Katalysators durch Hydroperoxyd berücksichtigt, während die H. v. Eulersche Arbeit die Möglichkeit eines Vergleichs der Dissoziationskonstanten der Hämin-hydroperoxyd- und der Katalase-hydroperoxyd-Verbindung schafft. Es würde aber den Rahmen des Nachwortes sprengen, wenn ich auf alle diese Arbeiten einginge. Besonders hervor heben will ich aber, daß in einer Arbeit von O. Warburg zusammen mit E. Negelein und A. Krebs, die Warburg in der Kaiser-Wilhelm-Gesellschaft vorgetragen hat, und über die in der Zeitschrift für angewandte Chemie 41, 265 (1928) referiert wird[295]), der Nachweis erbracht worden ist, daß das Atmungsferment ein sehr ähnliches Absorptionsspektrum hat wie in Pyridin gelöstes Hämin. Dieser Befund läßt es wahrscheinlich erscheinen, daß die von mir gemachten Erfahrungen über die katalytischen Wirksamkeiten des Hämins nicht lediglich als interessante Modellversuche zu werten sind, denn nach Warburg scheinen ja dem Hämin nahestehende Stoffe von größter biologischer Wichtigkeit zu sein, wenn sie auch nur in sehr geringen Mengen im Organismus vorkommen, während man bisher das Hämin als reines Kunstprodukt ansah, das biologisch keine Bedeutung hätte. Es ist also zu hoffen, daß, wie so oft in den Naturwissenschaften, auch in diesem Fall ursprünglich als Selbstzweck gesammeltes experimentelles Material durch spätere Erkenntnisse weitaus größere Wichtigkeit gewinnt.

[295]) Inzwischen im Original erschienen, und zwar Bio.Z. **193**, 334, speziell St. 343 Anm. 1928 und ausführlicher in den Naturwissenschaften **16**, 345 (1928).

Lebenslauf.

Ich, Ludwig Brann, wurde am 28. September 1899 in Berlin als Sohn des 1925 verstorbenen Herrn Hermann Brann, Bankiers, und seiner Gattin Hedwig, geborene Schönheimer, geboren. Nach einjähriger Privatausbildung, vierjährigem Besuch des Friedrich Werderschen Gymnasiums und siebenjährigem Besuch des Falk-Realgymnasiums, beide Schulen zu Berlin, machte ich Mai 1917 das Not-Abitur, um in den vaterländischen Hilfsdienst einzutreten, dem ich in der Presseabteilung des Kriegsausschusses für Öle und Fette bis Januar 1919 nachgekommen bin. Ab Herbst 1917 war ich an der Universität Berlin immatrikuliert, das erste Jahr in der medizinischen Fakultät, ab Herbst 1919 in der philosophischen Fakultät. Infolge des vaterländischen Hilfsdienstes konnte ich nur in sehr geringem Maße meinem Studium nachkommen. Ab Ostern 1919 war ich in Heidelberg immatrikuliert; ab Herbst 1919 hatte ich einen Platz in dem dortigen Universitätslaboratorium und widmete mich dem Studium der Chemie. Juni 1922 machte ich in Heidelberg das Verbandsexamen unter dem Vorsitz von Herrn Geheimrat Prof. Dr. Theodor Curtius. Ab Herbst 1922 war ich in München immatrikuliert, wo ich unter Herrn Prof. Dr. R. Pummerer und Herrn Prof. Dr. Erich Schmidt mich der organischen Ausbildung unterzog und gleichzeitig in der Abteilung von Herrn Prof. Dr. K. Fajans die physikalisch-chemische Ausbildung erhielt. Im November 1924 machte ich unter dem Vorsitz von Herrn Geheimrat Prof. Dr. Richard Willstätter mein Doktorandum. Von da ab widmete ich mich der Anfertigung meiner Doktorarbeit, bei deren Ausführung ich stete Anregung und Förderung durch Herrn Prof. Dr. Richard Kuhn erfuhr. Bei der im Herbst 1926 erfolgten Berufung von Herrn Prof. Dr. Kuhn nach Zürich folgte ich diesem dorthin und beendigte im Winter-Semester 1926/27 im Laboratorium für allgemeine und analytische Chemie der Eidgenössischen Technischen Hochschule Zürich meine Doktorarbeit.